

CATHERINE LIPPÉ

**CONSERVATION GÉNÉTIQUE DU CHEVALIER  
CUIVRÉ (*MOXOSTOMA HUBBSI*)**

**Effet tampon du temps de génération sur l'érosion de la  
diversité génétique**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en biologie  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE  
FACULTÉ DES SCIENCES ET GÉNIES  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2006

© Catherine Lippé, 2006

## Résumé

La constante hausse d'activités humaines, provoquant la destruction des habitats naturels, a mené à l'extinction de plusieurs espèces. La diversité génétique jouant un rôle primordial dans le potentiel évolutif d'une espèce, la conservation génétique fournit de plus en plus d'outils pour préserver la biodiversité. Le Chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*), espèce menacée exclusive au Québec, a une distribution extrêmement restreinte, limitée à la Rivière Richelieu et à une courte section du fleuve Saint-Laurent. Étonnamment, cette population unique et vieillissante possède un niveau de diversité génétique très élevé sans signe apparent de consanguinité, alors que son histoire démographique récente ainsi que les divers estimés de taille effective suggèrent un déclin graduel échelonné sur une longue période temporelle. Les résultats de ce mémoire mettent en évidence le potentiel des données génétiques dans un plan de rétablissement et identifient certains facteurs pouvant influencer l'impact génétique d'une réduction de taille chez les espèces à long temps de génération.

## **Abstract**

Increasing human activities have caused destruction and fragmentation of natural habitats, leading to the extinction of many species. Since genetic diversity plays an important role in the evolutionary potential of a species, conservation genetics is increasingly providing adequate tools needed towards the preservation of biodiversity. The Copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*), an endangered species of Québec, has an extremely restricted distribution, limited to the Richelieu River and a short section of the St. Lawrence River. Surprisingly, this unique and ageing remaining population exhibits a high level of genetic diversity without sign of inbreeding, where recent demographic history and effective population size estimates suggest a gradual demographic decline scaled on a large time period. Our results clearly demonstrate the potential of genetic data towards effective conservation, as well suggesting that long generation times may act as a buffering effect contributing to reduce the pace of genetic diversity erosion in threatened species.

## **Avant-propos**

Le chapitre 1 a été publié dans la revue *Molecular Ecology Notes* sous la référence : Lippé C, Dumont P, Bernatchez L (2004) Isolation and identification of 21 microsatellite loci in the Copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*; Catostomidae) and their variability in other catostomid. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 638-641. Le travail de laboratoire (à l'exception des premières étapes du développement de microsatellites, qui a été réalisé par BC Research Inc.), l'analyse des données et la rédaction ont été réalisés par C. Lippé sous la supervision du directeur L. Bernatchez et co-directeur P. Dumont.

Le chapitre 2 a été soumis pour publication à la revue *Molecular Ecology*. Ici encore, tout le travail en laboratoire, l'analyse des données et la rédaction ont été réalisés par C. Lippé sous la supervision du directeur L. Bernatchez et co-directeur P. Dumont.

Deux années de ma vie se sont écoulées depuis le début de cette maîtrise, et aucun jour n'aura passé sans que je m'arrête un instant pour faire progresser mes travaux, mes analyses ou ma rédaction. Une maîtrise est un travail à temps plein et même plus, mais en même temps si gratifiant. Malgré les moments plus difficiles, où l'on a l'impression d'être complètement stagnant pour plusieurs semaines et où nos données semblent ne rien vouloir nous dire, aujourd'hui j'ai le sentiment d'avoir accompli quelque chose dont je peux être fière. J'espère sincèrement que ce mémoire reflète tout le travail et le temps que j'ai consacré à l'aboutissement de ce projet, mais aussi le plaisir que j'ai eu à le faire.

Ce travail n'aurait jamais été possible sans l'intervention de plusieurs personnes, que je tiens à remercier sincèrement :

Je tiens à remercier ma famille en premier lieu pour plusieurs raisons qui font que sans eux, je ne serais pas qui je suis ni où je suis. Jean, Lise, Geneviève, Jonathan et Ézékiel (pour une période de temps plus courte mais bon!) ont dû et su endurer mes nombreuses pratiques de présentation, mes angoisses et mes sauts d'humeur (et je ne parle pas seulement des dernières années ici!). Sans leurs encouragements, motivation et participation, je ne serais probablement pas où je suis présentement. Si je ne vous l'ai pas assez déjà dit, MERCI!

Louis, premièrement pour m'avoir offert ce projet en particulier. Après seulement une année dans ton laboratoire à faire mon initiation à la recherche, tu auras appris à me connaître assez bien pour me suggérer un projet appliqué à la conservation des espèces menacées, domaine sur lequel est basé mon intérêt pour la biologie. Merci aussi pour avoir été un directeur de recherche exceptionnel à tous les points de vue. Du côté scientifique, tu auras toujours su me motiver et me pousser jusqu'à mes limites (ce qui n'aura pas toujours été facile je dois l'avouer!), ce qui m'aura donné une réelle confiance en moi et en mes capacités à la recherche. D'un autre côté, ta facilité de combiner joie de vivre et performance est un des aspects de ta personnalité, ou plutôt de ta façon de fonctionner, qui aura été pour moi un exemple et j'en suis sûre aura inspiré plus d'un de tes étudiants.

À Pierre, qui en tant que co-directeur de ce mémoire, m'a encouragé avec enthousiasme et sincère intérêt tout au long de mes travaux et m'aura offert le sentiment de participer activement au rétablissement du chevalier cuivré. Tu m'auras appris que la science n'est pas toujours compétition mais plutôt collaboration, une leçon qui espérons-le restera gravée tout au long de ma carrière.

Merci à plusieurs personnes du labo, qui avec les années sont devenus de véritables amis : Lucie Papillon, Bob Saint-Laurent, Pierre-Philippe Dupont, Anne-Marie Gale, Jérôme St-Cyr, Émilie Leclerc, Vicky Albert, Lysandre Landry, Mélissa Lieutenant, Guillaume Côté, Mélanie Dionne. Sans vous rien n'aurait été possible!

À toutes les personnes ayant contribué à l'échantillonnage, composante vitale de mon mémoire : Jean Leclerc, Nathalie Vachon, Alain Branchaud, Michelle Courtemanche, Gérard Boucher, Yves Chagnon, Serge Pépin, Yves Gauthier.

Merci à tout(te) mes amis(es), qui ont su me divertir durant mes moments de liberté! : Gee, Jeff, Marie-Ève, Anne-Marie, Scott, Vir, Munch, Jay, Bub, David, Phil, Isa, Véro, Judith, Jas, et tous ceux que j'ai oubliés!

## Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1 Rôles de la conservation génétique en biodiversité.....	1
1.2 Identification des préoccupations principales en conservation génétique.....	2
1.2.1 Effets génétiques d'une faible taille effective : Impact d'une perte de variabilité génétique et de la consanguinité sur le potentiel évolutif d'une espèce.....	2
1.2.1 Structure génétique, relocalisation et reproduction artificielle.....	4
1.2.3 La complexité du concept de taille effective de population et son évolution temporelle.....	5
1.3 Chevalier cuirré : espèce menacée.....	11
1.3.1 Statut et description de l'espèce.....	11
1.3.2 Distribution historique et actuelle.....	12
1.3.3 Problématique du chevalier cuirré.....	13
1.4 Conservation génétique du chevalier cuirré et étude d'impact d'une réduction de taille effective sur la diversité génétique des espèces longévives.....	15
2. Isolation and identification of 21 microsatellite loci in the Copper redhorse ( <i>Moxostoma hubbsi</i> ; Catostomidae) and their variability in other catostomid.....	17
2.1 Résumé.....	18
2.2 Abstract.....	19
2.3 Introduction.....	20
2.4 Materials and Methods.....	21
2.4.1 Microsatellite Isolation.....	21
2.4.2 Microsatellite Characterization.....	21
2.5 Results.....	22
2.6 Conclusion.....	23
2.7 Acknowledgements.....	23
3.1 High genetic diversity and no inbreeding in the endangered Copper redhorse, <i>Moxostoma hubbsi</i> (Catostomidae, Pisces): the positive sides of a long generation time.....	28
3.1 Résumé.....	29
3.2 Abstract.....	30
3.3 Introduction.....	31
3.4 Materials and Methods.....	34
3.4.1 Sample collection.....	34
3.4.2 DNA extraction and Genotyping.....	34
3.4.3 Data analysis.....	35
3.5 Results.....	39
3.5.1 Intrasample genetic diversity.....	39
3.5.2 Population structure.....	40
3.5.3 Relatedness.....	40
3.5.4 Estimation of effective population size.....	41
3.5.5 Bottleneck tests.....	41
3.5.6 Simulations.....	42
3.6 Discussion.....	42
3.6.1 Absence of population structure and high genetic diversity.....	43
3.6.2 Effective population size estimate and $N_e/N$ ratio.....	44

3.6.3 Evolution of genetic diversity through time .....	45
3.6.4 Implications for conservation .....	46
3.7 Acknowledgements.....	46
4. Conclusion .....	58



## Liste des tableaux

Table 2-1 Characterization of 21 microsatellite loci in <i>Moxostoma hubbsi</i> .....	24
Table 2-2 Cross-amplification data of 12 additionnal taxa of catostomids.....	26
Table 3-1 Sample size from different sites and time periods. See Figure 1 for locations of sampling sites.....	48
Table 3-2 Summary data at 22 microsatellite loci for the three sampling sites of <i>Moxostoma hubbsi</i> : sample size (N); number of alleles (A), allelic richness ( $A_R$ ) with rarefaction sample size in brackets if not of 40; observed ( $H_O$ ) and expected heterozygosity ( $H_E$ ); and inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ). -- represents non available data.....	49
Table 3-3 Number of significant homogeneity tests between all pairs of sampling sites (lower triangle), and pairwise $F_{ST}$ values (upper triangle).....	52
Table 3-4 Estimates of the long-term and contemporary effective population sizes according to different methods (identified source and type of estimate).....	53
Table 3-5 Expected heterozygosity ( $H_e$ ), expected heterozygosity under mutation-drift equilibrium ( $H_{eq}$ ), and excess (+) or deficit (-) in $H_e$ according to Cornuet & Luikart.....	54

## Liste des figures

- Figure 1-1 Vortex d'extinction au sein d'une petite population (Lacy & Lindenmayer 1995).....3
- Figure 1-2 Relations causales entre la réduction d'abondance et le risque d'extinction (Bernatchez 2004).....6
- Figure 1-3 Graphique des fréquences alléliques au sein d'une population non réduite comparées à celles observées suite à un goulot d'étranglement.....10
- Figure 3-1 Geographic distribution of the Copper redbone in Quebec, Canada. Black circles represent the sampling sites (Saint-Ours, Chambly and St. Lawrence River).....55
- Figure 3-2 Percentage of pairwise relatedness ( $r_{xy}$ ; Queller & Goodnight 1989) values between all individuals sampled (histogram) compared to relatedness of simulated unrelated (dashed curve) and fullsibs (solid curve). The dotted vertical line denotes the critical threshold used to determine fullsibs among natural individuals (0.23)..56
- Figure 3-3 Evolution of genetic diversity over a 200-year period according to BOTTLESIM simulations, assuming different  $N_e$  values kept constant over time with the same initial genetic diversity. A)  $O_A$  = observed number of alleles, B)  $H_O$  = observed heterozygosity. According to the percentage of retained observed number of alleles after 100 years, the minimal effective population size that should be aimed for the Copper redbone is around 400.....57
- Figure 4-1 Proportion du degré d'apparentement entre les individus plein-frères simulés (bleu) et les individus réels (rouge) échantillonnés pour le plan de reproduction artificielle.....61

# 1. Introduction

## 1.1 Rôles de la conservation génétique en biodiversité

L'augmentation de l'activité humaine durant les dernières décennies a provoqué une augmentation inquiétante du taux d'extinction des espèces, beaucoup trop élevé s'il est comparé à l'origine de nouvelles espèces (Wilson 1988). Dans le cas des poissons d'eau douce, les habitats sont surtout altérés par l'érosion des terres suite à la déforestation dramatique qui prend place un peu partout sur la planète. Le stress des populations restantes est accru par les pesticides, les fertilisants et les polluants chimiques utilisés pour l'agriculture, par la construction de barrages ainsi que par l'introduction d'espèces exotiques (Cambray 2000; Cooke *et al.* 2005). Ces facteurs peuvent provoquer une fragmentation des habitats naturels et une réduction de taille des populations naturelles, conduisant potentiellement à une augmentation du risque d'extinction due à l'environnement stochastique dans lequel ces populations évoluent (Cambray & Bianco 1998; Ricciardi & Rasmussen 1999; Frankham *et al.* 2002).

Depuis la fin des années 80, le domaine de la biologie de la conservation s'est élargi pour tenir compte de l'information obtenue à partir de marqueurs moléculaires. La variation génétique est devenue une priorité dans le domaine de la conservation biologique et fut reconnue comme une des trois composantes de la diversité biologique à conserver selon le IUCN (the World Conservation Union), étant perçue comme le matériel brut de l'évolution adaptative (McNeely *et al.* 1990). Le domaine de la conservation génétique a depuis énormément gagné en popularité et en importance. La diversité génétique étant une condition essentielle au potentiel évolutif des espèces, les plans de gestion se doivent aujourd'hui d'inclure des objectifs génétiques afin de préserver les espèces comme des entités dynamiques capables de s'adapter aux changements environnementaux (Frankel & Soule 1981; Frankham *et al.* 2002). Certains des objectifs principaux en conservation génétique sont entre autres de 1) déterminer les unités évolutives significatives (ESU :

Evolutionarily Significant Units) et les unités de gestion (MU : Management Units) par l'étude de la distribution de la variation génétique, 2) mesurer certains paramètres essentiels tels que la diversité génétique, le degré de consanguinité et la taille effective d'une population, 3) détecter une réduction de taille effective afin d'évaluer les risques d'extinction (Frankham *et al.* 2002). Le présent travail tente donc d'examiner chacun de ces paramètres afin d'aider à prendre, avec plus de chances de succès, de meilleures décisions qui influenceront l'avenir du chevalier cuirvé.

## **1.2 Identification des préoccupations principales en conservation génétique**

### **1.2.1 Effets génétiques d'une faible taille effective : Impact d'une perte de variabilité génétique et de la consanguinité sur le potentiel évolutif d'une espèce**

Le rôle de la variabilité génétique dans l'extinction des espèces a longtemps été discuté et mis à l'épreuve, controversé menant à un débat soutenu entre écologistes et généticiens (Lande 1988; Frankel & Soulé 1981; Caro & Laurenson 1994). Cependant, plusieurs études effectuées au cours des années ont su démontrer que la consanguinité et la perte de diversité génétique pouvaient mettre en péril certaines populations (Westemeier *et al.* 1998; Frankham *et al.* 1999; Bijlsma *et al.* 2000), et ce suite à l'observation d'une corrélation positive entre les traits liés au fitness et l'hétérozygotie chez plusieurs organismes (Franklin 1980; Frankham 1995; Reed & Frankham 2003; England *et al.* 2003). Ces travaux ont contribué à réconcilier les deux approches et les deux parties travaillent maintenant en collaboration afin de protéger cette diversité permettant à une population ou une espèce d'évoluer en réponse aux différentes pressions de sélection. C'est dans un environnement de stress, souvent infligé aux espèces menacées, qu'une faible diversité génétique peut avoir les répercussions les plus importantes (Wise *et al.* 2002). Ce lien entre

le fitness et l'hétérozygotie est donc important en conservation, puisqu'un grand nombre d'espèces ou de populations menacées souffrent d'un faible niveau de variation génétique (Gotelli *et al.* 1994; Mundy *et al.* 1997; Gibbs *et al.* 1997).

Suite à la démonstration de l'aspect essentiel de l'hétérozygotie, la notion de consanguinité prend énormément d'ampleur en conservation génétique. Résultat de la coalescence des allèles, elle peut être définie comme la probabilité d'identité par descendance au sein d'une population, qui est l'inverse de l'hétérozygotie et représente la perte de diversité génétique (1-H). La relation la plus simple qui relie le taux de consanguinité avec la taille effective d'une population peut s'exprimer ainsi :  $\Delta F = 1/2N_E$ , théorie qui suggère une présence plus importante de la consanguinité à l'intérieur d'une petite population suite à la dérive génétique accrue (Crow & Kimura 1970). La consanguinité résultante peut réduire le fitness par le biais d'une dépression de consanguinité de la population et augmenter son risque d'extinction en entraînant la population dans un vortex d'extinction (figure 1-1), et ce par la présence accrue de l'état homozygote d'allèles récessives (Tallmon *et al.* 2004a).

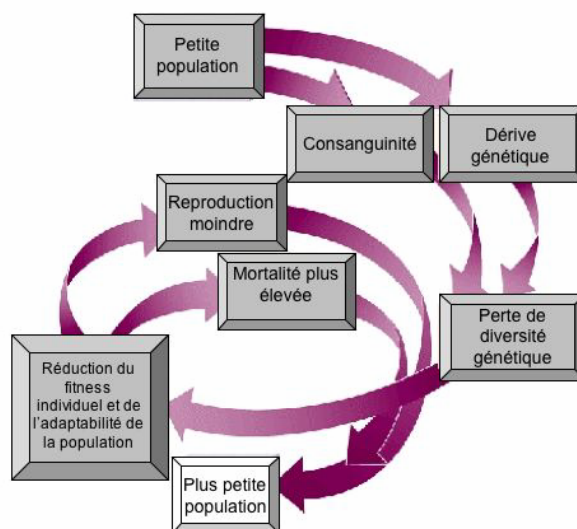


Figure 1-1 Vortex d'extinction au sein d'une petite population (Lacy & Lindenmayer 1995)

Contrairement à la perte de diversité allélique, les effets d'une dépression de consanguinité seront presque immédiats, c'est-à-dire qu'ils peuvent se manifester en l'espace de quelques générations (Amos & Balmford 2001). De ce fait réside l'importance de détecter et d'éviter si possible la consanguinité lors d'un programme de reproduction artificielle. Ballou & Lacy (1995) ont pu noter une réduction du taux de perte de diversité génétique de 20 à 30% dans certains cas. Dans ce dessein, certains estimateurs d'apparentement ont été développés tel que celui de Queller et Goodnight (1989), basé sur le génotype multilocus et tenant compte de l'hétérozygotie et des fréquences alléliques à chaque locus en donnant plus de poids aux allèles rares. L'estimateur,  $r_{xy}$ , représente la probabilité que les individus comparés deux-à-deux partagent un allèle par descendance directe de leur père ou de leur mère. Le présent travail tente de démontrer l'utilité de ce type d'estimateur pour éviter tout croisement consanguin lors d'une reproduction artificielle, objectif qui devrait être automatique afin de préserver un certain niveau d'hétérozygotie au sein de la population menacée.

### **1.2.1 Structure génétique, relocalisation et reproduction artificielle**

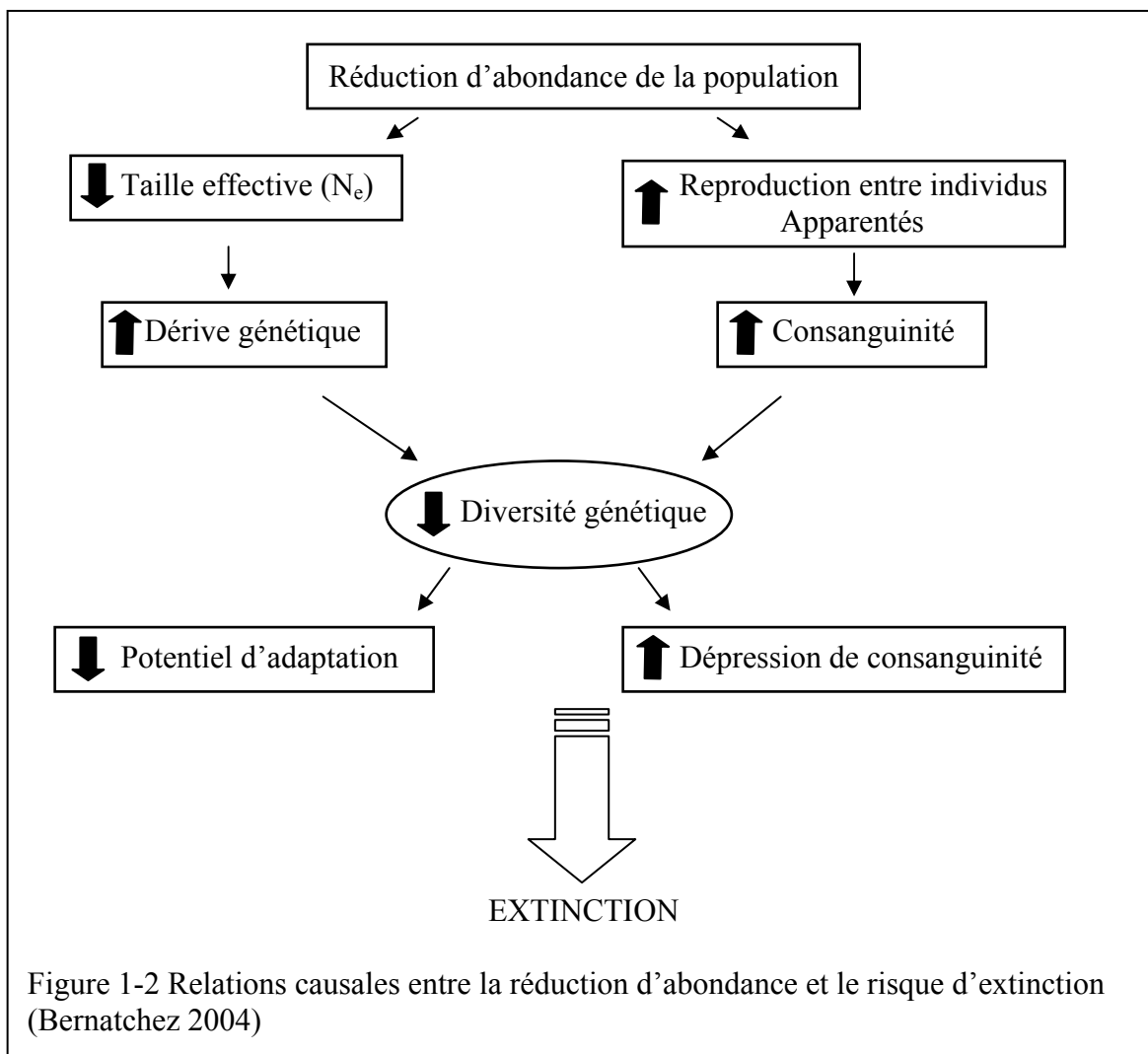
Une des observations les plus répandues, spécialement dans le cas des poissons d'eau douce, est une distribution non homogène de la variation génétique causant la différenciation de populations distinctes provenant de régions différentes et/ou occupant différents habitats (Wenburg *et al.* 1998; Potvin & Bernatchez 2001; Salgueiro *et al.* 2003). Cette répartition géographique des individus et de la diversité moléculaire peut être causée par différents facteurs, tels que l'isolement physique (ex : fragmentation des habitats), l'isolement comportemental (ex : philopatrie), les dynamiques écologiques (ex : densité populationnelle), les facteurs historiques, les impacts humains, etc. (Ciofi & Bruford 1999; Castric *et al.* 2001; Salgueiro *et al.* 2003). Suite à cette séparation, les groupes divergent selon l'intensité des différentes forces évolutives (migration, sélection, dérive génétique et mutation) d'une manière plus ou moins indépendante selon le potentiel de connectivité.

Étant donné que l'adaptation exige la différenciation génétique, un des buts principaux en conservation génétique sera d'identifier et de préserver la structure de populations historique en tenant compte de cette distribution spatiale dans les programmes de gestion (O'Connell & Wright 1997). L'information sur le nombre de populations présentes et leur degré de différenciation (ou d'apparentement) permettra d'élaborer des plans de conservation propres à chaque population, telle qu'une relocalisation d'individus d'une population plus nombreuse vers une population menacée génétiquement proche (Haig 1998). En effet, même si la relocalisation peut dans certains cas introduire une nouvelle diversité génétique menant à l'augmentation du fitness, l'immigration d'individus génétiquement divergents peut aussi mener à une dépression de consanguinité et réduire l'adaptation locale (Tallmon *et al.* 2004a). Il est aussi possible que la migration entre les sites d'occupation, possiblement interconnectés par un environnement propice au déplacement de l'espèce, soit telle que toute trace de différenciation génétique soit effacée. Dans un tel cas, la situation doit être envisagée sous un angle différent. La reproduction artificielle devient une option de choix, mais qui doit être entreprise avec beaucoup de précaution. En effet, il a été prouvé plus d'une fois que l'introduction d'individus résultants de croisements artificiels peut être néfaste à la survie des populations naturelles (Lynch & O'Hely 2001; Hansen 2002).

### **1.2.3 La complexité du concept de taille effective de population et son évolution temporelle**

Un des principes de base en biologie est qu'une taille finie de population augmente le risque d'extinction, la taille étant le facteur le plus influent des cinq critères pour classer une espèce en danger selon le IUCN (the World Conservation Union). Le problème de l'érosion génétique dépend principalement de la démographie d'une espèce (Figure 1-2). Wright (1931) proposa une formulation mathématique qui contribuera grandement à l'élaboration de plusieurs théories en génétique. Il définit la taille effective d'une population comme la taille d'une population idéale, où la reproduction est sexuée et où l'apparentement est aléatoire avec un nombre constant et égal entre les sexes de  $N_E$

individus diploïdes sans variance de succès reproducteur, qui évoluera génétiquement de la même façon que la population naturelle. Étant donné que ces conditions ne sont généralement pas rencontrées



en nature, du moins regroupées,  $N_E$  est généralement plus petite que  $N$  avec un rapport moyen  $N_E/N$  basé sur plusieurs espèces se situant environ à 0.11 (Frankham 1995).

$N_E$  peut avoir de grandes répercussions sur le taux de perte de variation génétique, la fixation des allèles délétères, le taux de consanguinité et aussi l'efficacité de la sélection naturelle dans son rôle de maintien des allèles avantageux et de purgation des allèles délétères (Wright 1969; Frankham 1996). Une taille effective d'environ 500 a été suggérée



par Franklin (1980) comme limite pour la conservation du potentiel évolutif de la population à long terme, mais cette valeur est toujours sujette à la controverse (Lande 1988; Franklin & Frankham 1998; Lynch & Lande 1998). Frankham *et al.* (2002) ont récemment proposé l'objectif plus réaliste de préserver 90% de la diversité génétique sur une période de 100 ans.

$N_E$  est un paramètre extrêmement difficile à évaluer, surtout pour les populations naturelles où souvent peu d'information est disponible (Schwartz *et al.* 1998). Il est presque impensable de récolter les données nécessaires au calcul de  $N_E$  par les méthodes démographiques, tels que la variance du succès reproducteur, spécialement dans le cas des espèces menacées où l'échantillonnage est extrêmement limité. Des méthodes analytiques pour estimer  $N_E$  à partir de données génétiques furent donc développées et abondamment utilisées par les biologistes en conservation; les méthodes temporelles (Waples 1989; Williamson & Slatkin 1999; Wang 2001; Berthier *et al.* 2002; Wang & Whitlock 2003), l'excès en hétérozygotie (Pudovkin *et al.* 1996; Luikart & Cornuet 1999) et le déséquilibre de liaison (Hill 1981; Bartley *et al.* 1992). La plupart de ces méthodes assument une augmentation de la dérive génétique suite à une diminution de  $N_E$  et l'absence de sélection, de mutation et de migration, en plus de supposer que  $N_E$  soit constante (figure 1-3). Au sujet de la dernière prémisse, la taille de population pour une espèce menacée subira des variations souvent importantes au fil des années et ces dernières peuvent ainsi influencer fortement le résultat de l'estimation. Il est donc crucial d'établir à quelle période de temps chaque estimé correspond et la réponse est habituellement complexe car les résultats dépendront non seulement des traits d'histoire de vie de l'espèce, mais aussi de la méthode utilisée pour estimer  $N_E$  ainsi que du plan d'échantillonnage (Nei & Tajima 1981; Waples 2005). Tirer des conclusions d'une comparaison entre estimés ou d'un rapport  $N_E/N$  basé sur des estimés ne correspondant pas à la même période temporelle peut être imprudent, plus particulièrement dans le cas où l'on utilise ce rapport afin de décider des actions de gestion à entreprendre. Dans une telle situation, il est essentiel de comparer plusieurs méthodes et de posséder une connaissance approfondie de la signification de chacun de ces estimés. Peu d'études ont poussé la comparaison des estimés de taille effective pour une population réduite sous les contraintes environnementales naturelles, les systèmes naturels

où l'échantillonnage et le nombre de marqueurs disponibles sont satisfaisants étant plutôt rares (Schwartz *et al.* 1998). Mon étude tente de démontrer la nécessité et l'utilité de combiner les méthodes, mais aussi l'impact de certains facteurs sur les résultats des différents estimés.

#### Caractéristiques des principaux estimés de taille effective

##### *N<sub>e</sub> à long-terme*

Estimé :	N <sub>e</sub> à long terme de l' <b>espèce</b>
Méthode :	$\theta = 4 N_e \mu$
Échantillonnage :	un seul échantillon
Caractéristiques :	Relation entre la diversité génétique et la taille effective d'une population à l'équilibre mutation-dérive

##### *N<sub>e</sub> de consanguinité*

Estimé :	N <sub>e</sub> de la génération parentale ( <i>t</i> -1)
Méthode :	Déséquilibre de liaison
Échantillonnage :	un seul échantillon
Caractéristiques :	Effets d'une réduction de taille effective ressentis à retardement, donc cet estimé peut être influencé par la taille effective de plusieurs générations précédentes (Crow & Denniston 1988; Waples 2005)

##### *N<sub>e</sub> de variance*

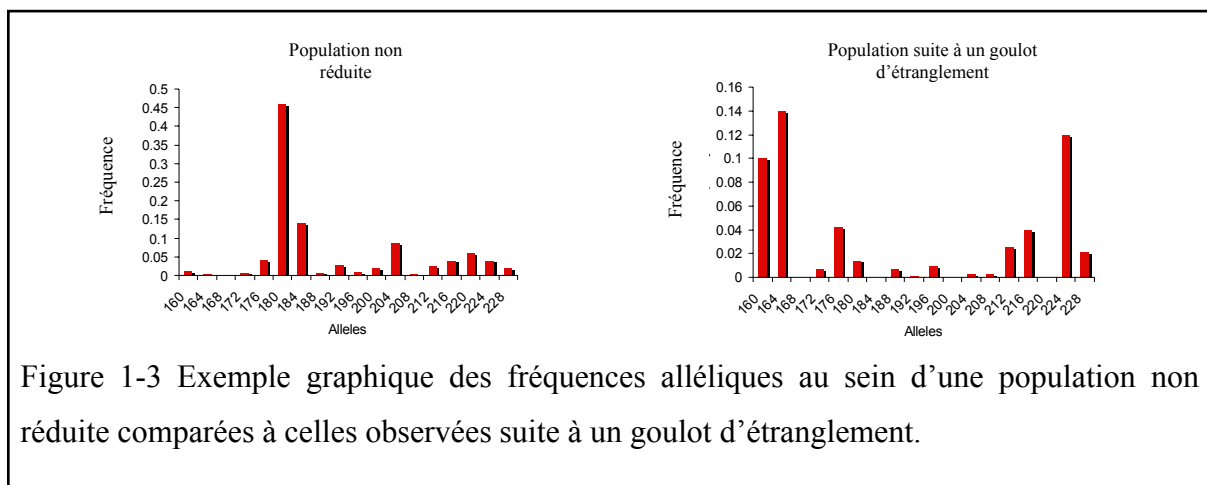
Estimé :	Moyenne harmonique de la génération 0 à <i>t</i> -1
Méthode :	Méthodes temporelles
Échantillonnage :	deux ou plus de deux échantillons, de préférence séparés par plus d'une génération
Caractéristiques :	Représente les processus démographiques récents (Crandall <i>et al.</i> 1999) Non influencé par la taille de la population initiale, sauf si le plan d'échantillonnage est de type I (échantillonnage avant la reproduction avec remplacement, ou après la reproduction; Kimura & Crow 1963; Nei & Tajima 1981; Nunney 1995; Waples 2005) Pour les espèces à générations chevauchantes, il y a possibilité d'un biais à la baisse de N <sub>e</sub> , surtout si peu de générations séparent les échantillons (Waples 2005)

Le terme goulot d'étranglement indique une baisse importante, subite et rapide de la taille effective pouvant être due à la fragmentation des habitats, à une diminution de la survie des individus et bien d'autres causes. Un tel processus provoque les mêmes changements néfastes typiques d'une faible taille effective, et ses effets directs peuvent être observés sur l'hétérozygotie et principalement sur la diversité allélique suite à l'élimination de beaucoup d'allèles rares (Nei *et al.* 1975). À plus long terme, un goulot d'étranglement risque de réduire le potentiel évolutif d'une population et devrait donc être détecté rapidement, afin de mieux gérer la survie des espèces en danger (Frankham *et al.* 1999).

Certains facteurs peuvent modifier, ou plutôt adoucir, l'impact d'une diminution de taille effective. Par exemple, une population ayant été petite pendant une longue période peut porter moins d'allèles délétères, donc être moins affectée génétiquement par un futur goulot d'étranglement (Hedrick 1994). La sévérité de la réduction de taille effective peut aussi jouer un rôle important dans le taux de perte de diversité génétique (England *et al.* 2003). Un goulot d'étranglement intense (taille grandement réduite pour une courte période) réduira d'une façon plus importante la diversité allélique qu'un goulot d'étranglement diffus (taille plus grande pour une période plus longue). Certains traits d'histoire de vie peuvent affecter le taux de croissance d'une population, tels que l'itéroparité, la variance du succès reproducteur et les générations chevauchantes, et conséquemment influencer la période de temps durant laquelle la population diminuée restera petite (Hoelzel 1999). Certaines études récentes ont aussi démontré que le temps de génération pouvait avoir un sérieux impact sur la vitesse d'érosion de la diversité génétique (Kuo & Janzen 2004; Goossens *et al.* 2005). C'est sur cet aspect particulier de l'espèce que je me suis arrêtée, pour observer l'effet tampon du temps de génération sur la perte de diversité génétique chez les espèces longévives.

Différentes méthodes génétiques ont été développées pour détecter un goulot d'étranglement dans les populations naturelles, la plupart étant basées sur la différence de fréquences alléliques entre des échantillons temporels (Luikart *et al.* 1998; Spencer *et al.* 2000). En conservation génétique, un problème typique est le manque d'échantillons temporels. Cornuet & Luikart (1996, 1998) ont donc proposé d'utiliser les fréquences

alléliques d'un seul échantillon, et ce en se basant sur le fait qu'une population ayant subi une récente réduction de taille subira une réduction plus rapide de la diversité allélique que d'hétérozygotie. L'hétérozygotie mesurée en supposant l'équilibre d'Hardy-Weinberg  $H_E$  va donc être plus élevée que l'hétérozygotie estimée à partir du nombre d'allèles observés  $H_{EQ}$  en supposant un équilibre mutation-dérive (Cornuet & Luikart 1996; Luikart & Cornuet 1998). Une autre méthode spécifique aux microsatellites, développée par Garza *et al.* (2001), se base sur le fait que les allèles perdus par dérive génétique lors d'un goulot d'étranglement ne sont pas toujours celles aux extrémités de l'étendue de la taille des allèles. Le nombre d'allèles va donc diminuer beaucoup plus rapidement que cet intervalle (figure 1-4).



Le succès de ces méthodes en conservation génétique dépend de plusieurs facteurs limitants, dont le nombre de locus polymorphes utilisés et la taille d'échantillonnage. Les espèces menacées d'extinction possèdent souvent une diversité génétique diminuée et un petit nombre d'échantillons disponibles à l'analyse. Dans une telle situation, il est suggéré de combiner les méthodes et d'utiliser plusieurs loci afin de s'assurer de la validité des résultats, chose faite au cours de cette maîtrise (Luikart *et al.* 1996, 1998).

## 1.3 Chevalier cuivré : espèce menacée

### 1.3.1 Statut et description de l'espèce

Le chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*), membre de la famille des Catostomidés (meuniers et chevaliers), fut d'abord décrit par Pierre-Étienne Fortin en 1866 sous le nom d'un *moxostome* déjà connu (Branchaud et Jenkins 1999), officiellement redécouvert en 1942 par Vianney Legendre et finalement nommé *Moxostoma hubbsi* en 1952. La présence de ce poisson n'a été répertoriée que dans quelques tributaires du fleuve Saint-Laurent (Richelieu, Yamaska, Noire, des Mille Îles et Maskinongé) ainsi que dans le fleuve même, entre Vaudreuil et le lac Saint-Pierre. Depuis sa découverte, son aire de répartition a diminué pour n'inclure aujourd'hui que le fleuve Saint-Laurent, où aucune capture n'avait été rapportée depuis le début des années '70, et la rivière Richelieu, où sont situées les deux aires de fraie connues pour l'espèce. C'est entre autres pour cette raison qu'en 1999, elle fut déclarée menacée en vertu de *la Loi sur les espèces menacées ou vulnérables* du Québec. Tout dernièrement, en 2004, le chevalier cuivré fut aussi désigné comme espèce en voie de disparition en vertu de la Loi sur les espèces en péril au Canada (Comité sur la situation des espèces en péril au Canada 2004;

[http://www.registrelep.gc.ca/virtual\\_sara/files/cosewic/sr%5Fcopper%5Fredhorse%5Ff%2Epdf](http://www.registrelep.gc.ca/virtual_sara/files/cosewic/sr%5Fcopper%5Fredhorse%5Ff%2Epdf)).

Les catostomidés sont caractérisés par une bouche ventrale entourée de lèvres charnues leur permettant de se nourrir au fond des cours d'eau. Le chevalier cuivré se démarque des autres catostomidés du Québec par son appareil pharyngien hautement spécialisé avec ses dents molariformes servant au broyage des coquilles de mollusques. Grâce à cette caractéristique morphologique qui facilite le broyage, le régime alimentaire du chevalier cuivré est très fortement dominé par les mollusques gastéropodes et pélecypodes (Mongeau et al. 1992). Cette spécificité, rare au sein la faune ichthyologique nord américaine (French 1993), réduit cependant l'adaptabilité de l'espèce aux changements environnementaux, d'autant plus que ces mollusques sont eux-mêmes en déclin dans plusieurs plans d'eau.

Les connaissances sur le chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*) et son habitat sont encore plutôt limitées, bien qu'au cours des dernières années, plusieurs aspects aient pu être documentés (Mongeau *et al.* 1986, 1992; La Haye 1992; Branchaud & Gendron 1993, Vachon 1999). L'examen des caractéristiques des lieux de capture au cours des années 1960 et 1970 suggérait que l'habitat estival était de profondeur relativement uniforme (de 4 à 7 m), sur un substrat dur, au voisinage des berges abruptes où la température dépassait 23°C (Mongeau *et al.* 1986, 1992). Ce portrait initial a cependant été modifié récemment au cours d'un projet de suivi télémétrique de vingt chevaliers cuivrés adultes et qui révèle une forte fréquentation des herbiers littoraux riches en mollusques (Projet de recherche de Maîtrise de Madame Simone Gariépy, Université du Québec à Rimouski). La fraie survient à la fin de juin et au début de juillet à des sites bien particuliers, alors que la température se situe entre 19 et 26°C (Dumont *et al.* 1997). Les frayères sont caractérisées par des eaux vives, un fond rocheux et très irrégulier (Mongeau *et al.* 1992). Dans la rivière Richelieu, les géniteurs se regroupent donc dans l'archipel des rapides de Chambly et en aval du barrage de Saint-Ours (Mongeau *et al.* 1986; Gendron & Branchaud 1991; La Haye *et al.* 1992). Le cycle reproducteur du chevalier cuivré est aussi particulier. Il atteint la maturité sexuelle vers l'âge de 10 ans et peut vivre jusqu'à 22 à 23 ans, certains disant même une trentaine d'années, et les femelles démontrent une fécondité remarquable allant jusqu'à 112 000 oeufs (Mongeau *et al.* 1986, 1992). Cette espèce se reproduit plus tard que les autres espèces de chevaliers et les juvéniles atteignent des tailles inférieures à celles atteintes par les quatre autres espèces congénères lorsqu'il est temps d'entamer l'hiver. Les jeunes de l'année fréquentent le même type d'aire de croissance que les autres moxostomes dans le Richelieu, c'est-à-dire les zones littorales peu profondes, caractéristiques retrouvées dans le secteur des îles Jeannotte et aux Cerfs (Vachon 1999).

### **1.3.2 Distribution historique et actuelle**

La répartition géographique de l'espèce au cours des dernières décennies s'est limitée à quelques cours d'eau dans la plaine du Saint-Laurent, soit les rivières Richelieu, Yamaska, Noire et des Mille Îles, à l'embouchure de la rivière Maskinongé et à différents

endroits dans le fleuve Saint-Laurent, entre Vaudreuil et l'aval du lac Saint-Pierre (figure 3-1). Dans les années 1960 et 1970, la seconde zone de concentration en importance se retrouvait dans la rivière Yamaska alors qu'en automne 1992 une seule capture y a été faite, ce qui suggère une énorme baisse de l'effectif dans cette rivière, dont la qualité de l'eau est fortement dégradée. Dans la rivière des Mille-Îles, 14 spécimens ont été récoltés dans les années 1970-80 alors qu'en 1996, seulement 2 individus y ont été recensés. En amont du lac Saint-Pierre, dans le couloir fluvial du fleuve Saint-Laurent, sept individus ont été capturés en 1970 alors qu'aucun spécimen n'a été capturé de 1991 à 1993 lors de pêches intensives. En 1998, un pêcheur commercial faisait mention de plusieurs captures dans le secteur Lavaltrie-Contrecoeur du fleuve Saint-Laurent, ce qui aura permis l'échantillonnage de bon nombre d'individus pour l'étude.

Des fouilles archéologiques ont démontré qu'à diverses époques de l'histoire et de la préhistoire, le chevalier cuivré était sûrement plus abondant, avec une abondance relative de trois à quatre fois supérieure à celle décrite dans les captures expérimentales des années 1960 et 1970 (Mongeau *et al.* 1986) et nettement supérieure à ce qui est maintenant observé dans une grande partie de l'aire de répartition (Ostéothèque de Montréal Inc. 1984; Courtemanche & Elliot 1985). Le chevalier cuivré serait donc en régression évidente au Québec. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer cette baisse de la population, dont l'eutrophisation et la sédimentation dues aux pratiques agricoles intensives, la construction de barrages (limite aux déplacements, envasement des fonds et disparition des frayères), une baisse du nombre de proies, la compétition avec la carpe (*Cyprinus carpio*) ainsi que la dégradation des eaux (Comité de rétablissement 2005).

### **1.3.3 Problématique du chevalier cuivré**

La répartition géographique de l'espèce est extrêmement restreinte. Les données actuelles révèlent que l'effectif le plus important de chevalier cuivré se retrouverait dans la rivière Richelieu, où deux sites de fraie sont connus à ce jour, soit les rapides de Chambly et l'aval du barrage de Saint-Ours (Comité d'intervention 1999). Ce barrage, initialement construit en 1849, et fréquemment endommagé, fut reconstruit sans passe migratoire en

1969 et aura empêché les déplacements des géniteurs vers l'amont durant plus de 30 ans (Dumont *et al.* 1997). Cette séparation physique aurait pu mener à une différenciation génétique et appauvrir le bagage génétique de cette population, question qui fut traitée au cours de ce travail. En 2000, grâce aux efforts du comité de rétablissement du chevalier cuivré, une passe migratoire a cependant été construite afin de permettre le libre passage des poissons et est utilisée par le chevalier cuivré. En 1998, suite à la déclaration de captures d'un pêcheur commercial des spécimens de chevalier cuivré dans le secteur Lavaltrie-Contrecoeur du couloir fluvial du Saint-Laurent, un suivi annuel de ces captures accidentelles s'est mis en place depuis 1999. Les spécimens ainsi capturés sont remis à l'eau après mesure, implantation d'une micro-puce et prélèvement d'un segment de nagoire pelvienne : l'analyse des données de capture de 253 spécimens entre 1999 et 2001 suggère une utilisation prolongée de cette section du fleuve au cours de la période d'eau libre par le segment adulte de la population (Vachon et Chagnon 2004). Une hypothèse qui devait être vérifiée était que ces chevaliers cuivrés étaient en migration durant le printemps, leur présence étant abondante aux mois d'avril et de mai et baissant généralement en juin (Vachon et Gagnon 2004). Aucune frayère n'a été trouvée dans le secteur, suggérant que ces individus se reproduisent dans un autre cours d'eau ou ailleurs sur le fleuve. Certains individus capturés à Saint-Ours (rivière Richelieu) démontraient d'ailleurs un profil de contamination indiquant qu'ils aient pu fréquenter le fleuve (de Lafontaine *et al.* 2002). À l'automne, les chevaliers cuivrés semblent utiliser le secteur Lavaltrie-Contrecoeur comme site de rassemblement d'automne ou même aire d'hivernage (Vachon & Gagnon 2004). La capacité de migration des catostomidés étant reconnue (*Moxostoma macrolepidotum* : Burr et Morris 1977, *Xyrauchen texanus* : Tyus 1987; Modde et Irving 1998 et *Chamistes cuju* : Scoppettone *et al.* 1986), cette hypothèse semblait plausible. Le mouvement de l'aval vers l'amont (de Saint-Ours vers Chambly) est aussi une possibilité dans le Richelieu, le barrage n'ayant pas toujours été infranchissable depuis 1849 étant donné les nombreux dommages subits et la présence d'une passe migratoire (Dumont *et al.* 1997).

Pour ce qui est de l'état de santé de cette population, les données récoltées au cours des années suggèrent un vieillissement de la population. La capture de chevaliers cuivrés juvéniles âgés de 2 ans et plus est pratiquement nulle depuis 30 ans et le suivi périodique



des captures de chevaliers cuivrés 0+ dans un tronçon témoin de la rivière Richelieu révèle entre autres que l'abondance relative de cette espèce est très faible et ne représente qu'une proportion inférieure à 0,35% des captures de jeunes chevaliers (Vachon 2002; Comité de rétablissement 2004). Le chevalier cuivré se reproduit donc encore dans le Richelieu, mais la situation semble être critique. De plus, une interruption de la maturation finale des gonades a été observée dans les années 1990 par Branchaud et Gendron (1993) chez la plupart des géniteurs capturés dans le milieu naturel, ce qui est plutôt inquiétant et pourrait être reliée à la contamination chimique du milieu (Gendron et Branchaud 1997). Pour ces multiples raisons, il se révélait nécessaire de réaliser des actions concrètes pour inverser le processus d'extinction, tel que le programme de reproduction artificielle auquel ce travail fut intégré (Comité d'intervention 1995, 1999; Comité de rétablissement 2004).

## **1.4 Conservation génétique du chevalier cuivré et étude d'impact d'une réduction de taille effective sur la diversité génétique des espèces longévives**

Au cours de cette maîtrise, mon objectif principal était de caractériser de façon aussi précise que possible la diversité génétique et sa distribution chez le chevalier cuivré, *Moxostoma hubbsi*. J'ai opté pour l'utilisation des microsatellites, marqueurs génétiques extrêmement utiles pour un examen détaillé de la variation génétique et des relations d'apparentement entre individus. Le premier objectif, ici présenté comme le premier chapitre du mémoire, était donc le développement d'un bon nombre de ces marqueurs polymorphes qui seraient utilisés tout au long de l'étude, mais aussi par la suite afin d'éviter les croisements consanguins lors d'un futur programme de reproduction artificielle. Le but visé par ce haut nombre de microsatellites était l'obtention d'une bonne précision et d'une réduction de la variance lors de l'estimation statistique des paramètres de différenciation de populations, de taux de consanguinité, d'estimation de taille effective et de détection d'un goulot d'étranglement. Le deuxième chapitre de ce mémoire présente plus d'un objectif, regroupant plusieurs paramètres génétiques estimés durant ces deux

dernières années. Pour réaliser ce projet, je me suis arrêtée sur l'étude des trois sites dans la plaine du Saint-Laurent où le chevalier cuirvé démontre une présence constante. Ainsi, il m'a premièrement été possible de décrire l'absence de structure de population basée sur l'examen de la distribution des fréquences alléliques et des génotypes. En second lieu, la diversité génétique au sein de l'espèce fut quantifiée, la plupart des espèces menacées présentant souvent un faible taux de diversité. Ensuite, je me suis dédiée à l'estimation d'un des paramètres les plus cruciaux mais complexes en conservation génétique, la taille effective d'une population, afin de déterminer si le potentiel évolutif de l'espèce était menacé. Étant donné la diversité des méthodes disponibles et le peu de systèmes empiriques permettant de comparer ces méthodes dans le cas d'une population naturelle, il me semblait important de tester chacune de celles s'appliquant au cas du chevalier cuirvé. En effet, malgré plusieurs études ayant mesuré la taille effective, deux caractéristiques sont spécifiques à notre étude, soit : (i) le grand nombre de loci utilisés, et (ii) l'importante taille d'échantillonnage pour une espèce menacée. La comparaison ne visait en aucun cas de choisir l'estimé le plus accommodant mais plutôt une interprétation détaillée de l'histoire démographique de l'espèce, ce qui aura été fait en combinant ces résultats à la détection d'un goulot d'étranglement dans le passé récent du chevalier cuirvé par différentes méthodes statistiques. Finalement, dans l'objectif de participer activement au plan de rétablissement par l'entremise du projet de reproduction artificielle, je me suis livrée à plusieurs séances de laboratoire intensifs dans le seul but de mesurer le degré d'apparentement entre chaque paire de géniteurs potentielle, et ce dans un délai de 24 heures afin de réduire le temps de captivité des poissons. Globalement, ces résultats auront mis en évidence l'effet tampon de certains facteurs sur l'érosion de la diversité génétique, tels que le temps de génération et la vitesse de réduction de taille effective, et donnent espoir qu'il n'est pas trop tard pour entreprendre des actions de gestion dans le cas des espèces longévives telles que le chevalier cuirvé.

1 **2. Isolation and identification of 21 microsatellite loci in**  
2 **the Copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*;**  
3 **Catostomidae) and their variability in other catostomid**

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

## 1 2.1 Résumé

2

3 Les Catostomidés sont une importante famille de poissons d'eau douce dont la distribution  
4 s'étend sur toute l'Amérique du Nord, en plus de quelques espèces en Eurasie. Ce papier  
5 décrit le développement de marqueurs microsatellites spécifiques à une espèce de  
6 catostomidé hautement menacée, le Chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*).  
7 L'amplification de ces marqueurs a de plus été testée sur plusieurs autres espèces de la  
8 même famille. Cent soixante-huit loci tétra-nucléotidique ont été séquencés, avec comme  
9 résultat le développement de 21 marqueurs microsatellites polymorphiques, avec un  
10 nombre moyen de 8.5 allèles par locus et un niveau d'hétérozygotie moyenne variant  
11 entre 0.52 et 1.00. Entre sept et 19 loci ont été amplifiés avec succès chez 12 autres  
12 membres de cette famille, avec deux à 18 loci polymorphiques par espèce.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

## 1 **2.2 Abstract**

2

3 Catostomidae represent an important family of freshwater fishes mainly distributed in  
4 North America, but also found in Eurasia. This paper describes the development of  
5 microsatellite DNA markers for a highly threatened member of this family, the Copper  
6 redhorse (*Moxostoma hubbsi*), as well as cross-catostomids amplifications. 168 tetra-  
7 nucleotide loci were screened to develop 21 polymorphic markers, with an average  
8 number of 8.5 alleles per locus and observed heterozygosity ranging between 0.52 and  
9 1.00. Successful amplification was obtained for 12 other members of the family at  
10 between seven to 19 loci, with between two to 18 loci being polymorphic per species.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

## 2.3 Introduction

Catostomidae represent an important family of freshwater fishes comprising 61 species that are mainly distributed in North America but also found in Eurasia (Bernatchez & Giroux 2000). Many species of this family have suffered from increased anthropogenic effects that have resulted in their demographic decline. Among these, the Copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*) has been listed as threatened in Canada under the Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada since 1987, as vulnerable under the IUCN (The World Conservation Union) Red List of Threatened Species since 1996 and as threatened under the Act respecting threatened and vulnerable species in Quebec since 1999. This status is mainly due to an extremely restricted and shrinking geographic distribution, now limited to the Richelieu River and a short section of the St. Lawrence River in Quebec, Canada. In order to prevent the extinction of the Copper redhorse, recovery efforts are focusing on a future supportive breeding program, with the intent of using genetic markers to avoid inbreeding and outbreeding depression. Thus, information on the population structure and individual relationships will be necessary in order to choose parents and appropriate locations for reintroduction. To further these objectives, the first step was the development of microsatellite genetic markers, described within this paper. Cross-species amplification and primer utility has been tested in twelve other catostomids: *Moxostoma valenciennesi*, *M. robustum*, *M. anisurum*, *M. macrolepidotum*, *M. carinatum*, *Scartomyzon congestus*, *Thoburnia rhothoeca*, *Hypentelium nigricans*, *Minytrema melanop*, *Erimyzon oblongus*, *Catostomus catostomus*, *C. commersonii*. As karyotypic analyses strongly suggests Catostomids are tetraploid (Uyeno and Smith 1972, Ferris & Whitt 1980), special attention was devoted to ascertaining if any primers amplified duplicate microsatellite loci during analyses.

## 1 **2.4 Materials and Methods**

### 2 **2.4.1 Microsatellite Isolation**

3

4 Genomic DNA was extracted from liver samples of *M. hubbsi* using a Dneasy  
5 extraction kit (QUIAGEN). Microsatellite enrichment by biotin capture- di-nucleotide  
6 ( $CA_n$  and  $TC_n$ ) and tetra-nucleotide ( $GATA_n$ ) microsatellites from those samples was  
7 carried out by BC Research Inc. (Vancouver, BC, Canada). We obtained 384 bacterial  
8 plasmid clones of random genomic restriction fragments containing di- and tetra-  
9 nucleotide motifs. Purified plasmids were amplified directly in 50- $\mu$ l reactions  
10 containing: (10.4 mM Tris-HCl, pH 9.0, 52 mM KCl, 1.56 mM  $MgCl_2$ , Triton X-100  
11 0.1%), 62.5  $\mu$ M of each dNTP's, 348.6  $\mu$ M forward and reverse sequencing M13  
12 universal primers, and 9 units of *Taq* DNA polymerase. Reaction mixtures were  
13 amplified by polymerase chain reaction (PCR) in a Biometra T-1 thermocycler with an  
14 initial denaturation time of 5 min at 94 °C followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, 40 s at  
15 60°C and 1 min at 72 °C, finalizing with a 10 min of elongation phase at 72 °C. Among  
16 168 clones tested containing tetra-nucleotide motifs, 76 have successfully been amplified.  
17 Approximately 5  $\mu$ l of the PCR products was loaded onto a 1.2% agarose gel stained with  
18 ethidium bromide in order to ensure sufficient product for sequencing, which was carried  
19 out on an ABI<sup>TM</sup> Prism 3100 sequencer (Perkin Elmer). Microsatellite primers were  
20 developed for 36 sequences using Primer3 software (Rozen & Skaletsky 1998) and  
21 Amplify version 1.2 (Engels 1993).

### 22 **2.4.2 Microsatellite Characterization**

23

24 Locus variability in the Copper redhorse and other catostomids was tested with  
25 total genomic DNA extracted from fin tissue, using the Dneasy kit (QUIAGEN). PCRs  
26 were carried out in a 11- $\mu$ l reaction containing: 1  $\mu$ l (25-50 ng) of total genomic DNA,  
27 1.2  $\mu$ l of reaction buffer (10.9 mM Tris-HCl, pH 9.0, 54.5 mM KCl, 1.6 mM  $MgCl_2$ ,  
28 Triton X-100 0.1%), 56.8  $\mu$ M of dGTP, dCTP and dATP, 28.4  $\mu$ M of dTTP, 0.5 pmol of  
29 forward and reverse primers, 1.7  $\mu$ M of dUTP TAMRA (Molecular Probe) fluorescent

1 incorporation labeling and 2 units of *Taq* DNA polymerase. For *Mohu-Lav200* and  
2 *Mohu-Lav212*, MgCl<sub>2</sub> concentration was reduced to 1.2 mM. The PCR reactions were  
3 performed using a Biometra T-1 thermocycler with identical thermal cycling conditions  
4 as previously explained except for the annealing temperature, which was specific to each  
5 locus (Table 2-1). An 8% denaturing polyacrylamide gel was used to separate PCR  
6 products by electrophoresis. Bands were visualized on an FMBIO II scanner (Hitachi)  
7 and scored using the GENESCAN-500 size standard (Applied Biosystems, Inc.). Locus  
8 variability in the Copper redhorse was successfully analyzed for 20 to 23 (depending on  
9 locus) individuals sampled from the St-Lawrence River (Table 2-1). The software  
10 GENETIX 4.03 (Belkhir et al. 1996-2004) was used to calculate the observed and expected  
11 heterozygosity. If more than two alleles were detected for some individuals, the loci were  
12 considered as being duplicated (Table 2-1 and Table 2-2).

13

## 14 **2.5 Results**

15

16 Of the 33 primer pairs developed from the genomic bank, 21 amplified  
17 polymorphic loci for the Copper redhorse (Table 2-1). The number of alleles ranged from  
18 3 to 18 with an overall average of 8.5 alleles per locus, while observed heterozygosities  
19 ranged from 0.52 to 1.00. We tested for Hardy-Weinberg equilibrium using the Markov  
20 chain method in the GENEPOP package version 3.4 (Raymond & Rousset 1995) in order  
21 to estimate heterozygote deficiency or excess for each locus (Guo & Thompson 1992).  
22 No departure from HWE was detected following Bonferonni corrections for multiple  
23 tests ( $\alpha = 0.05$ ,  $k = 21$ ) (Rice 1989). A preliminary Fisher's test of linkage disequilibrium  
24 implemented in GENEPOP v3.4 over 210 locus pair tests indicated one locus pair (*Mohu-*  
25 *Lav198* and *Mohu-Lav347*) in linkage disequilibrium at the table-wide significance level  
26 of 0.05 ( $P < 0.0002$ ). Three primer pairs amplified duplicate loci of tetraploid origin, one  
27 for which the two loci were polymorphic (*Mohu-Lav211*), whereas the others amplified  
28 only one polymorphic and one monomorphic locus (*Mohu-Lav229* and *Mohu-Lav270*).  
29 Between two to five individuals per species were tested for cross-specific amplification  
30 (Table 2-2).



## 1 **2.6 Conclusion**

2

3        Amplifications worked well for most species using identical reagent and thermal  
4 cycling conditions, especially for other members of the genus *Moxostoma* but also for  
5 *Scartomyzon* species. Overall, these results illustrated the utility of these 21 loci towards  
6 assessing patterns of genetic diversity and parentage in the Copper redhorse as well as in  
7 other species of the genus *Moxostoma*. A subset of these markers should also be  
8 applicable to any other member of the catostomid family.

## 9 **2.7 Acknowledgements**

10

11        This research was supported by the World Wildlife Fund Canada, the Société de  
12 la faune et des parcs du Québec, the Fondation de la faune du Québec, and by the  
13 Canadian Research Chair in conservation genetics of aquatic resources. We are  
14 particularly grateful to Gérard Boucher, Alain Branchaud, Yves Chagnon, Jean Leclerc,  
15 Nathalie Vachon, Serge Pépin and Yves Gauthier for providing biological tissues, to  
16 Lucie Papillon and Robert Saint-Laurent for technical assistance in the laboratory, and to  
17 Anne-Marie Gale and Sean Rogers for helpful comments on this manuscript.

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

1 **Table 2.1** Characterization of 21 microsatellite loci in the copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*) from the St-Lawrence River

Locus ID	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	T <sub>a</sub>	n	Range	A	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	T*
<i>Mohu-Lav194</i>	(GATA) <sub>24</sub>	<b>F:</b> CTTTTTCTCCTGGCGAACG <b>R:</b> CACGCAGCGGAGGTATTATT	60	23	131-187	8	0.87	0.83	
<i>Mohu-Lav198</i>	(TAGA) <sub>15</sub>	<b>F:</b> TGTTTTATTTCCAGCCCTAA <b>R:</b> TATAGTGCGCTGTGTGAATTGTG	60	23	175-203	4	0.78	0.66	
<i>Mohu-Lav200</i>	(ATCT) <sub>18</sub>	<b>F:</b> GCTTTTGTTCCTTTTTCTGA <b>R:</b> CCCCAAACCTTTTGAACGGTA	63	23	134-186	10	0.83	0.78	
<i>Mohu-Lav203</i>	(TGAG) <sub>15</sub> (GATA) <sub>10</sub>	<b>F:</b> TGTTTATTTTATTTGGCTTTTGAA <b>R:</b> CACTCTACACTCACTCTGCCAAA	60	23	123-167	8	0.7	0.78	
<i>Mohu-Lav211</i>	(ATCT) <sub>18</sub> GTCT(ATCT) <sub>8</sub>	<b>F:</b> CTGCAGTCTCAAACACATGG <b>R:</b> CGCTGCTGAGTATGTATGGA	63	20	135-183	11	0.8	0.83	*
<i>Mohu-Lav212</i>	(GATA) <sub>19</sub>	<b>F:</b> CGATAACAGCATGGGATCAA <b>R:</b> TCGATGAGTCACCCAACAAC	60	12	178-198	5	0.58	0.76	
<i>Mohu-Lav213</i>	(ATCT) <sub>17</sub>	<b>F:</b> GAAATGTTGCCAGGTCGTCT <b>R:</b> TCATCCTTGAAGCTGATGAAAA	60	22	137-169	7	0.91	0.8	
<i>Mohu-Lav229</i>	(TAGA) <sub>21</sub>	<b>F:</b> CGCCACTGTATCCCCTAT <b>R:</b> CTCGGGTGTGCACTCATTC	63	23	157-245	15	0.87	0.8	*
<i>Mohu-Lav237</i>	(GATA) <sub>29</sub>	<b>F:</b> TGGGTTTTGAATGACATGAGAG <b>R:</b> TCGCCCCAAAATAAAAATCA	63	23	143-183	11	0.91	0.87	
<i>Mohu-Lav268</i>	(GACA) <sub>5</sub> (GGCA) <sub>2</sub> GGTATA(TAGA) <sub>23</sub>	<b>F:</b> CACAACAGCAGAATTAAGACAGG <b>R:</b> TCACCTTCAATCCATCATCAA	59	23	172-228	10	0.78	0.75	
<i>Mohu-Lav270</i>	(ATCT) <sub>17</sub>	<b>F:</b> CTGCAGCACATTGTTCCATT <b>R:</b> TGTAAGTCGTATGAACAATGACAAA	59	23	196-240	11	0.65	0.87	

1 **Table 2.1 (cont.)**

Locus ID/ GeneBank	Repeat motif	Primer sequences (5'-3')	T <sub>a</sub>	n	Range	A	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	T*
<i>Mohu-Lav277</i>	(TCTG) <sub>3</sub> (TCTA) <sub>20</sub>	<b>F:</b> GAAGGCCAGAGGGAAAGAAC <b>R:</b> AGTTTTGCAAGAGCAAGCAC	59	23	167-199	7	0.83	0.76	*
<i>Mohu-Lav286</i>	(ATCT) <sub>17</sub>	<b>F:</b> TGGGGTTCATCAATCAATCA <b>R:</b> GGATGACATGAGGGGGAAT	59	22	184-208	6	0.82	0.63	
<i>Mohu-Lav294</i>	(GATA) <sub>18</sub>	<b>F:</b> TGTGAGTTCGGGTTTAGAGC <b>R:</b> CGGAAATAGAAGCAATGACAGG	63	23	137-221	18	0.87	0.92	
<i>Mohu-Lav296</i>	(ATCT) <sub>21</sub> (TTCT) <sub>11</sub>	<b>F:</b> TCCTGCTATCTTTGGCATATTTT <b>R:</b> TGCCCAACAGAGAAAGGAAC	60	23	145-221	15	1	0.91	
<i>Mohu-Lav305</i>	(GATA) <sub>9</sub> (GACA) <sub>3</sub> GAGA(GACA) <sub>6</sub> GATA	<b>F:</b> TGGAGAGTTATTTTCTCACATCTAA <b>R:</b> AACTTGAATGTTTGATATTGCTTTT	60	22	183-191	3	0.59	0.61	
<i>Mohu-Lav306</i>	(CAGA) <sub>7</sub> (TAGA) <sub>5</sub> (CAGA) <sub>7</sub> (TAGA) <sub>19</sub>	<b>F:</b> TCTTCTTCTATCATCCTACCTACTCAA <b>R:</b> TTCGGACTACTCTTGCTATAATGTTT	59	21	222-246	7	0.52	0.8	
<i>Mohu-Lav321</i>	(CTAT) <sub>2</sub> CTGT(CTAT) <sub>10</sub> CTGT(CTAT) <sub>12</sub> (CTGTCTAT) <sub>2</sub> CTGT(CTAT) <sub>3</sub>	<b>F:</b> TCAAGCTAATTAGAAAACGATTTATTG <b>R:</b> GTCATGAGGGGCCGAAAT	60	23	138-202	7	0.7	0.75	
<i>Mohu-Lav329</i>	(TAGA) <sub>2</sub> TATA(TAGA) <sub>16</sub>	<b>F:</b> AGCTTGGTAAAGCCTTGTCG <b>R:</b> CCTTGTTCTGACTTCAAGTGCTA	60	23	171-211	6	0.7	0.68	
<i>Mohu-Lav336</i>	(GATA) <sub>15</sub> (GAGAGATA) <sub>3</sub>	<b>F:</b> TCATAATTGATCAGTGTATTATGCAA <b>R:</b> GTTGGGAACCACTGTGTGTG	60	21	184-212	6	0.57	0.72	
<i>Mohu-Lav347</i>	(GATA) <sub>14</sub>	<b>F:</b> TGTTTTATTTCCAGCCCTAA <b>R:</b> AGTGCGCTGTGTAATTGTG	60	23	171-199	4	0.78	0.66	

2

3 T<sub>a</sub>, annealing temperature used in polymerase chain reaction; n, sample size of Copper redhorse used to assess variability;  
4 range, allelic range (bp); a, number of alleles; H<sub>O</sub>, observed heterozygosity; H<sub>E</sub>, expected heterozygosity; T\*, duplicated locus.

**Table 2.2** Cross-amplification data of 12 additional taxa of catostomids

Locus	<i>Moxostoma robustum</i>	<i>Moxostoma macrolepidotum</i>	<i>Moxostoma anisurum</i>	<i>Moxostoma carinatum</i>	<i>Moxostoma valenciennes</i>	<i>Scartomyzon congestus</i>
n	3	5	5	5	5	5
<i>Mohu-Lav194</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mohu-Lav198</i>	•	+	+	+	•	+
<i>Mohu-Lav200</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Mohu-Lav203</i>	+	+	+	+	-	+
<i>Mohu-Lav211</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mohu-Lav212</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mohu-Lav213</i>	+	+	+	+	+	•
<i>Mohu-Lav229</i>	+*	+*	+*	+*	+*	+*
<i>Mohu-Lav237</i>	+	+	-	+	+	+
<i>Mohu-Lav268</i>	+	+	+**	+	+	+
<i>Mohu-Lav270</i>	•	+	•	•	+	-
<i>Mohu-Lav277</i>	•*	+*	+*	+*	+*	+*
<i>Mohu-Lav286</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Mohu-Lav294</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mohu-Lav296</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mohu-Lav305</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mohu-Lav306</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mohu-Lav321</i>	+	-	+	+	+	•
<i>Mohu-Lav329</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mohu-Lav336</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Mohu-Lav347</i>	•	+	+	+	•	+
Total Amp	20	19	19	19	19	19
Total Poly	16	19	18	18	17	17

**Table 2.2 (cont.)**

Locus	<i>Thoburnia rathoeca</i>	<i>Hypentelium nigricans</i>	<i>Minytrema melanops</i>	<i>Erimyzon oblongus</i>	<i>Catostomus catostomus</i>	<i>Catostomus commersonnii</i>
n	5	5	3	2	2	5
<i>Mohu-Lav194</i>	•	•	•	-	-	-
<i>Mohu-Lav198</i>	+	+	•	+	•	•
<i>Mohu-Lav200</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Mohu-Lav203</i>	-	+	+	•	-	-
<i>Mohu-Lav211</i>	+	+	•	•	-	-
<i>Mohu-Lav212</i>	•	•	•	•	•	•
<i>Mohu-Lav213</i>	•	+	•	+	•	•
<i>Mohu-Lav229</i>	+*	+*	•	•	+*	+*
<i>Mohu-Lav237</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Mohu-Lav268</i>	+	+	•	-	+	+
<i>Mohu-Lav270</i>	+	-	•	-	-	•
<i>Mohu-Lav277</i>	+*	•*	•*	+*	+*	+*
<i>Mohu-Lav286</i>	+*	+	-	•	-	-
<i>Mohu-Lav294</i>	•	+	+	•	+	+
<i>Mohu-Lav296</i>	+	+	-	•	•	-
<i>Mohu-Lav305</i>	+	•	•	•	•	+
<i>Mohu-Lav306</i>	•	+	+	-	-	-
<i>Mohu-Lav321</i>		-	-	-	-	-
<i>Mohu-Lav329</i>	+	+	•	-	-	-
<i>Mohu-Lav336</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Mohu-Lav347</i>	+	+	•	+	•	•
Total Amp	17	17	16	13	10	10
Total Poly	12	13	4	5	4	5

-, multiple bands, smear of no amplification; • amplification but insufficient data to determine polymorphism; +, amplification and polymorphism; \*, duplicated loci with non overlapping range; \*\*, duplicated loci with overlapping ranges.

Total Amp, total number of amplified (+ or •) loci within species.

Total Poly, total polymorphic loci within species.

**3.1 High genetic diversity and no inbreeding in the endangered Copper redhorse, *Moxostoma hubbsi* (Catostomidae, Pisces): the positive sides of a long generation time**

### 3.1 Résumé

La diversité génétique étant maintenant reconnue comme en grande partie responsable du potentiel évolutif d'une espèce, un plan de gestion devrait automatiquement intégrer certains aspects génétiques dans ses efforts de conservation. Le Chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*) est une espèce menacée avec une distribution exclusive au Québec, Canada, limitée à la rivière Richelieu et à une courte section du fleuve Saint-Laurent. La population, graduellement fragmentée depuis 1849, est caractérisée par un déclin de sa taille de population ainsi que par un manque flagrant de recrutement. Un total de 269 échantillons ont été collectés entre 1984 et 2004, pour ensuite être génotypés à l'aide de 22 loci microsatellites. Les résultats n'indiquent qu'une seule population, avec un  $F_{ST}$  global de seulement 0.0038. Étonnamment, malgré une faible abondance (~500), un très haut niveau de diversité génétique a été observé en comparaison avec les valeurs communes pour les poissons d'eau douce (nombre moyen de 12.5 allèles/locus et  $H_O$  de  $0.77 \pm 0.08$ ). De plus, aucune évidence de consanguinité n'a été observée, avec une valeur d'apparentement moyenne ( $r_{xy}$ ) de  $-0.00013 \pm 0.11737$ . L'estimé de  $N_e$  à long terme était de 4476 (SMM), alors que les estimés de  $N_e$  contemporains allaient de 107 à 568, suggérant un déclin démographique graduel de la population étant donné l'absence de détection d'un goulot d'étranglement récent. À l'aide de simulations, il a été estimé que  $N_e$  devrait demeurer au-dessus de ~400 dans le but de préserver 90% de la diversité génétique sur une période de 100 ans. Globalement, ces observations appuient d'autres études confirmant qu'un long temps de génération peut agir en tant que tampon contribuant à réduire le taux d'érosion de diversité génétique chez certaines espèces menacées.

### 3.2 Abstract

Since the evolutionary potential of a species is partly governed by its genetic diversity, management plans should integrate genetic concerns into active conservation efforts. The Copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*) is an endangered species, with an exclusive distribution limited to the Richelieu River and a short section of the St. Lawrence River in Quebec, Canada. The population, gradually fragmented since 1849, is characterized by a decline in population size and a lack of recruitment. A total of 269 samples were collected between 1984 and 2004 and genotyped using 22 microsatellite loci, which indicated that these fish comprise a single population, with a global  $F_{ST}$  value of only 0.0038. Surprisingly, despite a small census size (~500), we observed a high degree of genetic diversity compared to common values for freshwater fishes (average number of 12.5 alleles/locus and average  $H_O$  of  $0.77 \pm 0.08$ ). Also, no evidence of inbreeding was found with a mean pairwise relatedness value ( $r_{xy}$ ) of  $-0.00013 \pm 0.11737$ . Long term  $N_e$  was estimated at 4476 (SMM), whereas contemporary  $N_e$  values ranged from 107 to 568, suggesting a gradual demographic decline of the population, as no bottleneck could be detected for the recent past. By means of simulations, we estimated  $N_e$  would need to remain over ~400 in order to retain 90% of the genetic diversity over 100 years. Overall, these observations corroborates other recent empirical studies confirming that long generation times may act as a buffering effect contributing to reduce the pace of genetic diversity erosion in threatened species.



### 3.3 Introduction

Active management is required to prevent the extinction of species that are threatened, including actions such as supportive breeding programs (defined as the propagation and release of offspring from a subset of wild spawners) or artificial migration events (translocation of individuals from other populations). Since the evolutionary potential of a species is partly governed by its genetic diversity, management plans must be concerned with genetic objectives (Frankham *et al.* 2002). The primary challenge is to integrate genetic concerns into active conservation efforts and to consider the utility of the genetic information obtained as potentially useful for future conservation efforts (DeSalle & Amato 2004). Genetic considerations can greatly contribute to the success of such recovery plans in various ways (Hedrick & Kalinowski 2000; Tallmon *et al.* 2004a). Strong population structure would indicate the existence of different reproductive sites and nurseries, thus implying the necessity to protect those different essential habitats. In such cases, individuals should not be translocated or used for breeding programs between genetically distinct locations in order to avoid decreases in local adaptation (Tallmon *et al.* 2004a). Loss of genetic diversity and an increase in inbreeding are two other major genetic issues to be considered. Ballou & Lacy (1995) noted that the avoidance of inbred crosses in a supportive breeding program may reduce the rate of loss of genetic diversity of 20 to 30% in some cases. Moreover, both historical bottlenecks and current population size of threatened species have been found to explain observed contemporary levels of genetic diversity and heterozygosity (e.g. Westemeier *et al.* 1998; Hoelzel 1999; Hauser *et al.* 2002; Johnson *et al.* 2004; Knaepkens *et al.* 2004; Pastor *et al.* 2004). It is therefore imperative to detect natural population declines at the earliest stage possible, and to monitor the flux in the effective population size, and its effect on the populations' overall genetic health.

Especially during a period of population size reduction, the rate of loss of genetic diversity could be influenced by demographic stochasticity, variance in reproductive success, and disrupted gene interactions (Hoelzel 1999). The impact of a population reduction will also depend on life-history traits that affect growth rate (e.g. iteroparity,

overlapping generations and lifespan of long-lived species), as well as the severity and pattern of the bottleneck experienced and population recovery (England *et al.* 2003; Weber *et al.* 2004). All processes contributing to a reduction in genetic diversity may also potentially be buffered by long generation times, as observed among different vertebrate species (Amos & Balmford 2001; Kuo & Janzen 2004; Goossens *et al.* 2005). Individuals of a long-lived species, even during a bottleneck period, would maintain the high level of genetic diversity through out more years than other species, passing it along to the next generation.

Natural populations of freshwater fishes are increasingly threatened by anthropogenic habitat destruction and fragmentation, contributing to a reduction of population sizes and increasing the risk of extinction due to the stochastic nature of the environment (Cambray & Bianco 1998; Ricciardi & Rasmussen 1999; Frankham *et al.* 2002). Dams, agriculture, and urban development degrade water quality, encourage the introduction of exotic species by modifying the environment, and increase habitat fragmentation. These represent the main current threats to the long term survival of freshwater fishes (Cambray 2000; Cooke *et al.* 2005).

Members of the catostomid family are distributed over North America and Asia, and inhabit a wide range of habitats. Many members of this family, such as the razorback sucker (*Xyrauchen texanus*) and the robust redhorse (*Moxostoma robustum*), are threatened by common factors: migration barriers, and habitat degradation by urbanization and agriculture (Cooke *et al.* 2005). Unfortunately, little conservation effort has been implemented for the conservation of these less economically important, “non-recreational” freshwater fishes (Cooke *et al.* 2005). The Copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*) is found only in Canada, and its current geographic distribution being limited to the St. Lawrence and Richelieu River in Quebec (Fig. 1). The species is characterized by an elongated lifespan (30 years) and late age at maturity (minimal age at maturity being 10 years), as well as a very specialized diet, which is almost entirely composed of mollusks (Mongeau *et al.* 1992). Only two breeding sites are known for the whole species, both located in the Richelieu River (Saint-Ours and Chambly), and have been progressively isolated by a dam

since 1849. The original cribwork structure was likely not fully impassable: it was frequently damaged and equipped with a fish pass that was not replaced when the dam was rebuilt in 1969. Fish passage was possible for a few weeks during high spring discharge, typically in early spring, apart from the Copper redhorse spawning migration period in June (Dumont *et al.* 1997). Historically, the Copper redhorse was a lot more abundant relatively to other catostomids (Courtemanche & Elliot 1985). Current census size for the whole species based on mark-recapture studies in feeding habitats has been estimated in 2000 to less than 500 adult individuals (Vachon & Chagnon 2004). Moreover, the species is characterized by an extremely reduced reproductive success, translating into a lack of recruitment (Vachon & Chagnon 2004); only one young of the year has been captured each year in the Richelieu River since 1998 (Vachon 2002; COSEWIC in press). Consequently, these factors have potentially reduced its adaptability to a changing environment, therefore amplifying the vulnerability of the species to extinction. For these reasons, the Copper redhorse was listed as vulnerable in 1996 under the IUNC Red List of Threatened Species, as threatened by the Act respecting threatened and vulnerable species in Québec since 1999, and as endangered in 2004 by the COSEWIC (Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada).

A recovery plan, involving numerous governmental and non-governmental agencies (see Comité de rétablissement du Chevalier Cuivré, 2004), was undertaken in 1995 with the ultimate goal of avoiding the extinction of the Copper redhorse. These efforts have led to an increase on the knowledge on the biology of the species, the development of artificial rearing procedures (Branchaud *et al.* 1933, 1995), the creation of a sanctuary (Pierre-Étienne-Fortin sanctuary, 1999) to protect the main spawning site in the Richelieu River, Chambly (Fig.1), and the construction of a migratory pass in 2001 at the Saint-Ours dam, reestablishing the connection between the two sections of the Richelieu River. Finally, a supportive breeding program was initiated in 2004, and is expected to continue for the next ten years (Bernatchez 2004). Within the context of this recovery plan, the main objectives of this study were to: 1) test the hypothesis that, given its highly reduced census size, the Copper redhorse is characterized by low genetic diversity, high levels of inbreeding and small effective population size; 2) test the null hypothesis of no genetic differentiation

among samples of Copper redhorse collected throughout the current distribution range of the species, and 3) explore the future evolution of genetic diversity under different demographic scenarios by means of simulations.

## **3.4 Materials and Methods**

### **3.4.1 Sample collection**

Non-invasive samples (preserved bones, scales, and pelvic fin clips preserved in 95% ethanol) were collected at three locations: Chambly (1984) and Saint-Ours, which are the two known spawning sites in the Richelieu River, and the Lavaltrie-Contrecoeur section of the St. Lawrence River (1999-2004), where no Copper redhorse were captured since year 1973 until 1998, even after exhaustive fishing efforts in the area (Fig. 1). Samples were obtained between 1984 and 2004 from various sources, including commercial fishery accidental bycatch in the St. Lawrence River. In total, 269 fish were available for analysis (Table 1). Fish length varied between 480 and 780 mm, representative of the size range for adult individuals (Vachon & Chagnon 2004). For the Saint-Ours sample, as the Copper redhorse shows a generation time of 10-15 years and as our sampling represents the adult section of the population, we assumed that our data set was composed by 2 generations (1985 and 1990-2004).

### **3.4.2 DNA extraction and Genotyping**

Genomic DNA extraction for fin tissue samples was performed using DNeasy Tissue Kit (QIAGEN), following the standard procedure for animal tissue samples provided by the manufacturer. DNA from scale samples was extracted using the method described in Nielsen *et al.* (1997), with the exception that scale digestion occurred for 2h at 37°C, and DNA was concentrated to a final volume of 50 µl using Microcon-30 microconcentrators (Amicon). DNA from bone samples was extracted as detailed in Hagelberg (1994), with the exception that bones were ground using a stone grinder, of

which only 0.1 g was added to 2 ml of digestion buffer [0.47 M EDTA pH 8.0, 0.5% of SDS, 0.04 mg of proteinase K], and incubated overnight at 56°C with constant agitation. Total digestion extracts were used for phenol-chloroform DNA extraction, as in Olsen *et al.* (1996), and concentrated twice using the Microcon-30 microconcentrator (Amicon), diluted to a final volume of 50 µl and purified with QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) to eliminate PCR inhibitors. Extractions for scale and bone samples were performed at different time periods and using laboratory benches period than those from fresh tissues in order to minimize the risk of contamination.

Twenty-two loci were used for genetic analyses (see Table 2; Lippe *et al.* 2004; Tranah *et al.* 2001). PCR conditions and amplification profiles are as described in Lippé *et al.* (2004). For scale and bone samples, 45 amplification cycles were carried out in a 25-µL reaction modified from Herrmann & Hummel (1994), and containing: 2 µL (50-100 ng) of DNA extraction product, 2.5 µL of reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% gelatin), 4 µg of BSA (*Bovine Serum Albumin*), 57 µM of each dNTP's (except for dTTP; concentration 26.5 µM), 0.1 pmol of each primer, 0.5 U of *Taq* polymerase and 4.92 µM of Tamra labeled dUTP. PCR products were separated on an 8% denaturing polyacrylamide gel and visualized on an FMBio II scanner (Hitachi), with the GeneScan®-500 [ROX]<sup>TM</sup> size standard (Applied Biosystems, Inc.) for standardized size scoring. Three controls were performed to test for contamination; a blank control extraction in each set to verify the purity of the DNA extractions and the cleanliness of reagents and containers, an empty well in each PCR plate to check the purity of the PCR reagents, and an empty loading lane in each gel to look for carryover contamination. A mixture of samples from various groups was also done together, to ensure concordance of results. No false amplifications were detected.

### **3.4.3 Data analysis**

#### **3.4.3.1 Genetic Diversity, Hardy-Weinberg and linkage disequilibrium tests.**

Standard genetic statistics were used to measure genetic variability; number of alleles (A), observed heterozygosity (H<sub>O</sub>), expected heterozygosity (H<sub>E</sub>) under Hardy-Weinberg assumptions, and F<sub>IS</sub> estimates were computed with MSANALYSER (Dieringer &

Schlötterer 2003). Allelic richness ( $A_R$ ) was calculated with the rarefaction method to account for unequal sample size with HP-RARE software (Kalinowski 2004). Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium were examined at each microsatellite locus within each sample group defined earlier using GENEPOP version 3.4 (Guo & Thompson 1992; Raymond & Rousset 1995). Fisher exact test of linkage disequilibrium was performed between all pairs of loci using GENEPOP, with 10000 dememorizations, 10000 batches and 10000 iterations per batch. Critical significance levels were adjusted for multiple comparisons by using the sequential Bonferroni correction ( $\alpha = p/n$ ; Rice 1989).

#### **3.4.3.2 Population structure.**

Nineteen loci were used for these analyses owing to the non-amplification of three loci from bone and scale extracted DNA (*Mohu-Lav212*, *Mohu-Lav213*, *Mohu-Lav306*). GENEPOP was used to conduct exact tests of genic differentiation between groups at each locus using allelic distribution, groups being defined by sites and generations (Guo & Thompson 1992). Global and pairwise genetic divergence in allelic identity was quantified by estimating  $F_{ST}$  values using GENETIX 4.03 (Weir & Cockerham 1984; Belkhir *et al.* 1996-2004). Finally, a model-based Bayesian clustering method (STRUCTURE version 2.1) was used to corroborate  $F$  statistic results with regard to the number of estimated populations of Copper redhorse present in the system (Pritchard *et al.* 2000). Three simulations (runs) were conducted for each model ( $k = 1-5$ ) assuming admixture and correlated allele frequencies between populations with a 100 000 replications burn-in period and 1 000 000 MCMC replicates.

#### **3.4.3.3 Relatedness.**

The level of inbreeding of the Copper redhorse was estimated by computing pairwise relatedness between all pairs of individuals (without regard to sampling groups), using the estimator  $r_{xy}$  using KINSHIP 1.3.1 (Queller & Goodnight 1989). Expected unrelated and fullsib pairwise relatedness was simulated from observed allelic frequency distributions at 19 loci (10000 simulated pairs of fullsibs using KINSHIP), and the distribution of simulated fullsib relatedness was used to detect fullsibs within the natural population ( $P > 0.01$ ; Blouin *et al.* 1996).

#### 3.4.3.4 Effective population size.

The long-term species effective population size ( $N_e$ ) was estimated using the heterozygosity-based method (Otha & Kimura 1973), which predicts that at mutation-drift equilibrium under the stepwise mutation model (SMM),  $N_e$  should equal  $[(1 / 1 - H_e)^2 - 1] / 8\mu$ , where  $\mu$  is the mutation rate and  $H_e$  is the mean expected heterozygosity across all loci. As this method depends on equilibrium processes, which makes it heavily sensitive to mutation model, we also calculated the long-term  $N_e$  under the infinite allele model (IAM) according to the equation:  $N_e = H / 4\mu (1 - H)$ . We calculated long-term  $N_e$  for each locus individually as well as for the mean expected heterozygosity across all loci, and used  $\mu = 5 \times 10^{-4}$ , the rate most commonly applied in fishes (Estoup & Angers 1998). Several estimates of contemporary  $N_e$  were calculated for comparative purposes (Waples *et al.* 1993). The linkage disequilibrium method produces a contemporary (parental generation) inbreeding effective population size estimate ( $N_{eb}$ , effective number of breeding adults), generated from a single temporal sample. We used the method developed by Hill (1981) and Bartley *et al.* (1992), which is based on the expectation that smaller populations will accumulate more disequilibrium over time. It was performed on all samples captured since 1999 ( $N=165$ ), since results indicated no population structure, with 22 loci using the program NEESTIMATOR, version 1.3 (Peel *et al.* 2004), which measures disequilibrium ( $D^*$ ) with Burrow's composite measure of disequilibrium (Campton 1987). The linkage disequilibrium method is considered the more accurate estimate because: i) the methodology requirements are appropriate for the sampling employed in this study ( $> 90$  individuals,  $> 6$  loci : Waples 1991; Bartley *et al.* 1992), ii) it is ideally used for small natural fish populations (Waples & Teel 1990), iii) it avoids the underestimation of  $N_e$  by temporal methods with only one generation separating the samples (Waples 1989; Tallmon *et al.* 2004b), and iv) it does not appear to be seriously affected by a reduction in population size (Waples *in review*). For comparison and exploration purposes, temporal methods were also applied to estimate variance  $N_e$  for the interval between historical and current samples (harmonic mean of the effective sizes in generations 0 through  $t-1$ ), by examining genetic drift and change in allelic frequencies over time. According to plan I (Nei & Tajima 1981), historical samples from Saint-Ours 1985 and Chambly 1984 were assigned as generation zero (0), while generation one ( $t$ ) was assigned to all samples caught since 1999, utilizing

19 loci. With the generation time approximated at ~10 - 15 years, and a lifespan of ~30 years, the sample interval of 15 years represents roughly one generation. The first temporal method implemented in MCLEEPS (version 1.1) estimated  $N_e$  using Monte Carlo Likelihood, and 100000 Monte Carlo replicates were calculated for each value of  $N_e$  (Anderson *et al.* 2000). The maximum value for  $N_e$  was set to 600, after testing different maximum values (200, 600, 1000) to make sure that the result was non sensitive to this parameter, so that the estimate was reliable. MLNE software was used for the second temporal method estimating the maximum 'pseudo-likelihood', still using 600 as the maximum value for  $N_e$  after testing the sensitivity of the method, as well as a third temporal method, the moment estimator (Nei & Tajima 1981; Wang 2001).

#### 3.4.3.5 Bottleneck tests.

We tested for recent and pronounced reduction in population size using two different methods. BOTTLENECK 1.2.02 (Piry *et al.* 1999), which is purported to be particularly sensitive to recent population bottlenecks (0.8-4.0  $N_e$  generations), examines summary statistics through comparisons of a population's heterozygosity excess ( $H_e$ ) to that which is presumed to be found at mutation-drift equilibrium ( $H_{eq}$ ). In such cases, allelic diversity is predicted to be lost faster than heterozygosity (Cornuet & Luikart 1996). A two-phase model (TPM; Di Rienzo *et al.* 1994) was used with 95% SMM and 5% IAM, with 12% variance of multiple-step mutations, and 5000 simulation iterations as suggested by Piry *et al.* (1999). Bottleneck significance was tested with the standardized differences test (Cornuet & Luikart 1996). The 'M' test uses gaps in allelic frequency distribution to detect population bottlenecks whereby the number of alleles ( $k$ ) experiences a faster reduction than the allele size range( $r$ ). Therefore, the ratio  $M$  ( $k/r$ ) under the SMM model should be smaller in bottlenecked populations (Garza & Williamson 2001). Parameter values were set to the following:  $p_s$  (proportion of one-step mutations) = 90% and  $\Delta_g$  (average size of non one-step mutations) = 3.5. We estimated the  $\theta$  parameter ( $4N_e\mu = \theta$ ) using  $N_e$  calculated from the linkage disequilibrium method, and the mutation rate of  $5 \times 10^{-4}$  mutation/locus/generation (Estoup & Angers 1998). The critical ratio ( $M_C$ ) was calculated with CRITICAL\_M software to test significance, such that 95% of the 10000 simulations of an equilibrium population had  $M > M_C$ .



### 3.4.3.6 Simulations.

The conservation goal of maintaining 90% of the initial genetic diversity over a 100 year period (Frankham *et al.* 2002) is arguably a more realistic objective than the optimal  $N_e$  of at least 500 to maintain genetic diversity and avoid inbreeding depression historically recommended by Franklin and Frankham (1998). BOTTLESIM (version 2.6) was used to explore the evolution of genetic diversity in long-lived species with overlapping-generations during the next 200 years and estimate the sustainable population size needed in order to meet this specific conservation objective (Kuo & Janzen, 2003). Estimations were performed with different pre- and post-bottleneck  $N_e$  values, and other simulation parameters were constant (lifespan = 30 years, age at maturity = 10 years, completely overlapping generations, dioecious reproduction, random mating, sex ratio 1:1, 200 years simulated, 1000 iterations).

## 3.5 Results

### 3.5.1 Intrasample genetic diversity

Levels of genetic diversity observed in the Copper redhorse were unexpectedly high, given the low estimate of census size for the species (Table 2). All loci were moderate to highly polymorphic, with number of alleles per locus ranging from 4 to 23 (mean = 12.5), and observed heterozygosity across all samples ranging from 0.61 to 0.93 (mean =  $0.77 \pm 0.08$ ).  $A_R$  was also highly variable among loci, with an overall mean value of 9.05 (ranging from 3.16 to 15.89), but was very similar between sites, which represented a first indication for weak genetic population structure among sampling sites. The null hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium was not rejected after correcting the significance level for the number of pairwise comparisons of populations and loci ( $n = 88$ ;  $\alpha = 0.001$ ), with only three sample-locus combinations (*DLU405* and *Mohu-Lav270* in the St. Lawrence River and *Mohu-Lav296* in Saint-Ours) showing significant heterozygote deficiencies. Fisher's exact test for linkage disequilibrium between all pairs of loci revealed only one pair of loci showing significant linkage (*DLU405* and *Mohu-Lav237*) after sequential Bonferroni

correction ( $n = 231$ ,  $\alpha = 0.0002$ ), and 30 if considering the standard level of significance of 5%.

### 3.5.2 Population structure

Using a significance threshold of 0.05, only 19 of 114 genic differentiation tests were significant. After sequential Bonferroni correction, significant heterogeneity of allelic distribution among samples was found in four comparisons only ( $n = 114$ ;  $\alpha = 0.0004$ ): St. Lawrence vs. Chambly (*Mohu-Lav203*;  $P = 0.00007$ ), Chambly vs. Saint-Ours 1990-2004 (*Mohu-Lav203*;  $P = 0.00020$  and *Mohu-Lav237*;  $P = 0.00029$ ) and Chambly vs. Saint-Ours 1985 (*Mohu-Lav347*;  $P = 0.00027$ ). A global  $F_{ST}$  value of only 0.0038 ( $P = 0.0001$ ) was observed, which reflected a very weak level of differentiation among all pairwise comparisons (ranging between 0.0019 and 0.0073) (Table 3). The null hypothesis of no population structure throughout the whole species distribution range could therefore not be firmly rejected. This was corroborated by the results of STRUCTURE, which revealed no detectable population structure among sample groups. Constant Bayesian posterior probabilities for only the single population model ( $k = 1$ ), as well as a lack of stability of the alpha parameter even after important burn-in period and run length, were all indicative of the absence of population structure (Pritchard *et al.* 2000). Therefore, the whole species is apparently represented by a single reproductive population.

### 3.5.3 Relatedness

No evidence of inbreeding was revealed by the distribution of pairwise relatedness estimates, as no overlapping between the observed pairwise relatedness estimates and the distribution of simulated fullsibs was found (Fig. 2). There was only a very small proportion of closely related individuals within the wild population, as evidenced by the mean relatedness value of  $-0.00013 \pm 0.11737$  (ranging from -0.93258 to 0.97420), typical of an outbred population. Indeed, the observed distribution closely matched the simulated distribution of values for unrelated individuals with relatedness values ranging from -0.35522 to 0.41012 (mean of  $0.00175 \pm 0.10971$ ). Using the simulated estimates of fullsib

pairwise relatedness, the fullsib detection threshold (0.01) was determined to be 0.23, with only 2.85% of all pairs of samples individuals being defined as fullsibs under this threshold.

### 3.5.4 Estimation of effective population size

The long-term species estimate of effective population size under the SMM mutation model (mean of 4476, with values ranging from 1577 to 57550 when using individual locus) was approximately one order of magnitude larger than the values obtained from the different methods used to obtain contemporary  $N_e$  estimates (Table 4). Under the IAM model, long-term  $N_e$  was estimated to 1674 (individual locus estimates ranging from 852 to 7103), which is still higher than the current  $N_e$  estimates. When comparing all  $N_e$  estimates, the linkage disequilibrium estimate was larger than the estimates from temporal methods. Yet, contemporary estimates were not strikingly different from census size estimates ( $N$ ), resulting in unusually high  $N_e/N$  ratios for a fish species. Census size was estimated to  $\sim 500$ , with the subsequent calculation of the  $N_e/N$  ratio ranging from 0.85 to 1.94 (when using the linkage disequilibrium method estimate;  $N_e = 480$ ).

### 3.5.5 Bottleneck tests

No evidence for a population bottleneck was detected. According to BOTTLENECK, no significant departure from mutation-drift equilibrium was observed for the entire population based on the standardized differences test ( $T_2 = -3.473$ ; probability = 0.00026), under the assumption that all loci fit the TPM mutation model. Slight heterozygosity excess was observed for 11 out of 22 loci, which is expected to occur by chance in populations under mutation-drift equilibrium (Table 5). Moreover, no evidence for population bottleneck could be inferred from the  $M$  ratio test either, with the average ratio among 22 loci (0.87) above the calculated critical ratio ( $M_c$ ) of 0.82 (only 6 loci under the threshold; Table 5).

### 3.5.6 Simulations

Simulated levels of genetic diversity (observed number of alleles (OA) and observed heterozygosity ( $H_O$ )) that would be retained after a 200 year period, with a stable population size characterized by an initial genetic diversity equal to the level we observed in empirical data, revealed that allelic richness declined much faster than  $H_O$ , (Figure 3). If the Copper redhorse population was to remain constant for the next 100 years with an effective population size of 480, 93.9% of the alleles present and 99.4% of the observed heterozygosity would be retained. To conform to general conservation goals to retain 90% of the genetic diversity over a 100 years period, the effective population size would therefore need to remain at a value above  $\sim 400$ , in which case 92.7% of the genetic diversity would be preserved.

## 3.6 Discussion

The main objectives of this study were to: 1) to test the hypothesis that highly reduced census size in the Copper redhorse is associated with impoverished genetic diversity, high levels of inbreeding and small effective population size; 2) test the null hypothesis of no genetic differentiation among samples of Copper redhorse collected throughout the current distribution range of the species, and 3) to explore the future evolution of genetic diversity under different demographic scenarios by means of simulations. Despite a small census size of the entire adult population ( $\sim 500$ ), the species exhibited a high degree of genetic diversity, well above average values commonly reported for freshwater fishes. No evidence of inbreeding was found, with a mean pairwise relatedness value which was typical for an outbred population. Yet, contemporary  $N_e$  estimates were roughly one order of magnitude less than the long term  $N_e$  estimated. This along with no evidence for recent population bottleneck, suggested that the demographic decline of the Copper redhorse occurred gradually. By means of simulations, we estimated that in order to reach the general conservation goal to retain 90% of the genetic diversity over a 100 years period, the effective population size of the Copper redhorse would need to remain over  $\sim 400$ , in which case 92.7% of the genetic diversity would be preserved.

Overall, these observations corroborate other recent empirical studies discussed below suggesting that a long generation time may act as a buffer that contributes to reduce the pace of genetic diversity erosion in threatened species.

### **3.6.1 Absence of population structure and high genetic diversity**

No evidence of population structure was detected, which indicated that the Copper redhorse is composed of a single panmictic population, which could contribute to increase its vulnerability to extinction in the case of any potential natural catastrophe or environment change. Yet, despite the fragmentation and population size reduction that the species has suffered in the recent past, the Copper redhorse was characterized by a high genetic diversity as well as a virtual absence of inbreeding. In comparison with freshwater fish that have an average heterozygosity of 0.54 ( $\pm$  0.25), the average found within our sample ( $0.77 \pm 0.08$ ) was surprisingly high (DeWoody & Avise 2000). The reasons behind these observations can be interpreted from two different perspectives. First, given the actual effective population size estimate (ranging between 107 and 568), and the long-term effective size estimate under SMM (4476), one explanation resides in the possibility that the gradual decrease of the long-lived Copper redhorse population has allowed for a better retention of genetic diversity. Namely, elongated lifespan of approximately 30 years and minimal age at maturity of about 10 years result in a long generation time that could buffer against the rate of loss of genetic variability. In addition, it has been reported for other long-lived species, such as the ornate box turtle (*Terrapene ornate*; Kuo & Janzen 2004) and the orang-utan (*Pongo pygmaeus*; Goossens *et al.* 2005) that not only long lifespan may influence the level of diversity observed, but the pattern of demographic fluctuation experienced by populations as well. High genetic diversity in the highly endangered razorback sucker (*Xyrauchen texanus*) was also observed and was explained by a gradual reduction in population size combined with life-history traits that are characteristic of long-lived species, as for the Copper redhorse (Dowling *et al.* 1996ab; Minckley *et al.* 2003; Dowling *et al.* 2005). In addition, it is also possible that the recent population perturbations have not yet affected the species genetic diversity. All sampled individuals were mature adults, thus representing progeny resulting from reproductive events of the former

generation that occurred 20-30 years ago. Assuming that the population would have suffered a pronounced population size decline in recent years, old individuals that were analyzed in this study could still possess most of the genetic diversity (both in terms of heterozygosity and occurrence of rare alleles) that characterized the species prior to demographic reduction.

High genetic diversity is typically suggestive of a genetically healthy population, and therefore represents a very positive asset for the recovery of the species. On the other hand, extreme caution should be used when interpreting results like these, as this does not necessarily mean that the Copper redhorse will not be affected by the reduction of  $N_e$  in the future. Indeed, long lifespan and gradual demographic decline may mask accelerated rate of genetic drift found in small populations (Kuo & Janzen, 2004), so monitoring is essential to keep track of the evolution of genetic diversity in long-lived species such as the Copper redhorse, which is experiencing a lack in recruitment and likely face the oncoming diminution of genetic diversity. Misinterpretation leading to the conclusions that the Copper redhorse population is healthy and does not need further conservation efforts would in fact be misleading.

### **3.6.2 Effective population size estimate and $N_e/N$ ratio**

Temporal estimates of contemporary  $N_e$  were lower than those obtained from the linkage disequilibrium method. This could be due to the fact that, when sampling scheme is according to plan I, variance effective population size estimated by temporal methods examines the variance of allele frequency between generations [Gen(0) to Gen( $t-1$ )], while the linkage disequilibrium estimate the inbreeding effective size of the parental generation [Gen( $t-1$ )] (Waples *in review*). These two estimates might therefore be different if the size of the population is not constant. Given the recent past of the Copper redhorse, it is therefore understandable that the estimate from linkage disequilibrium method was higher than temporal estimates. Neither the consequences, nor the signals of inbreeding due to shrinking population size may appear for several generations following a decline, resulting in a false sense of security when regarding large estimates of inbreeding effective

population size (Crow & Denniston 1988; Crandall *et al.* 1999; Schwartz *et al.* 1999). Moreover, large inbreeding effective population size, low census size and smaller variance effective population size, as we observed for the Copper redhorse, may be indicative of a historically large population with recent population reduction (Templeton & Read 1994; Gerber & Templeton 1996). We also have to consider that having only one generation separating our temporal samples implies that the harmonic mean of the effective sizes between generation 0 through  $t-1$  represents an extremely short time period (~1985-90), where not much changes in allele frequency could possibly be observed, so that temporal methods are not extremely reliable for this case.

The estimated  $N_e/N$  ratio was close to one, which was surprising given that Frankham (1995) had found a mean ratio of 0.11 across species, and could be seen as an additional indicator of a genetically healthy population (Mace & Lande 1991; Nunney & Campbell 1993; Frankham 1995). However, this result can be explained by the period of time that each estimate applies (Waples 2005). As explained above, the contemporary  $N_e$  estimate given by the linkage disequilibrium method is not statistically representative of the current generation, but the parental generation that created our sample, which means adult individuals that were living 20-30 years ago. The census size estimated in 2000 represents the actual number of adults in the population. Assuming that the population of Copper redhorse has been through a reduction in population in size during the past years, the  $N_e$  estimate from the linkage disequilibrium method would be higher than what would be found in the current generation, thus creating a disproportionate ratio. Overall, our results exemplifies that the absolute  $N_e/N$  ratio should be used very carefully for conservation purposes, and particularly so in species with long generation time..

### **3.6.3 Evolution of genetic diversity through time**

Both statistical methods utilized for inferring demographic history failed to detect the occurrence of a population bottleneck. Again, this may be explained by the sampling of only adult individuals. Under the assumption that the population size was reduced in the past 30 years, as ichthyologic surveys since the species' recognition in 1942 have indicated,

it could be too recent an event to detect its genetic consequences (Comité de rétablissement du Chevalier Cuivré, 2004).

### **3.6.4 Implications for conservation**

The results of the simulations suggested that for the conservation plan for the Copper redhorse to be successful from a genetic point of view, it would need to maintain the high genetic diversity found in the actual population over a long time period. Thus, to achieve retention of 90% of the current diversity over the next 100 years, a commonly suggested conservation goal (Frankham *et al.* 2002), simulations predict a minimum effective population size of ~400 is necessary. Assuming the average  $N_e/N$  ratio of 0.11 frequently observed in animals (Frankham 1995), this means that the recovery plan of Copper redhorse should seek to maintain a census size of approximately 4000 adult individuals in order to maintain such level of diversity in the long-term. Given the current census size of the single known population approximated to 500 individuals only, the continuing decline of the Copper redhorse and the lack of recruitment, the continuation of a supportive breeding program thus appears crucial in order to ensure the future of the population's genetic health, and should also include future monitoring of the genetic trends and consequences of conservation efforts (Bernatchez 2004; DeSalle & Amato 2004).

In this context, the most positive side of a long lifespan and late maturity is that high level of genetic diversity may persist for a longer time period, which allows more time to undertake proper conservation actions compared to species characterized by short generation time and lifespan.

## **3.7 Acknowledgements**

This research was supported by the World Wildlife Fund Canada, the Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec, the Fondation de la faune du Québec, and by the Canadian Research Chair in Conservation Genetics of Aquatic Resources. We are particularly grateful to Gérard Boucher, Alain Branchaud, Yves Chagnon, Jean Leclerc, Nathalie Vachon, Serge Pépin and Yves Gauthier for providing biological tissues, to Lucie



Papillon and Robert Saint-Laurent for technical assistance in the laboratory, and to Anne-Marie Gale, Sean Rogers for helpful comments. We would also like to thank Jeff Haddrath and Michael Hansen for their precious help with DNA amplification of scales and bones, and particularly Robin S. Waples for his wise insights regarding the complexities of effective population size estimation and interpretation for long-lived species with overlapping generations.

**Table 3-1** Sample size from different sites and time periods.

See Figure 1 for locations of sampling sites.

<b>Year</b>	<b>Chambly</b>	<b>Saint-Ours</b>	<b>St. Lawrence</b>
1984	33 <sup>1</sup>		
1985		29 <sup>2</sup>	
1990		6	
1993		6	
1994		11	
1996		12	
1999			51
2000			59
2001			10
2002		3	
2003		2	24
2004		23	

<sup>1</sup> bone samples

<sup>2</sup> scale samples

**Table 3-2** Summary data at 22 microsatellite loci for the three sampling sites of *Moxostoma hubbsi*: sample size (N); number of alleles (A), allelic richness ( $A_R$ ) with rarefaction sample size in brackets if not of 40; observed ( $H_O$ ) and expected heterozygosity ( $H_E$ ); and inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ). -- represents non available data.

Locus	Locality	N	A	$A_R$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$
<i>Dlu4296</i>	St-Lawrence	137	9	8.30	0.752	0.778	0.032
	Chambly (1984)	33	11	9.68	0.788	0.817	0.028
	Saint-Ours (1985)	22	9	8.81	0.864	0.779	-0.123
	Saint-Ours (1990-2004)	61	10	8.69	0.770	0.794	0.026
<i>Dlu405</i>	St-Lawrence	141	9	3.61 [10]	0.617	0.780	0.208
	Chambly (1984)	29	7	3.70 [10]	0.793	0.753	-0.064
	Saint-Ours (1985)	5	6	5.00 [10]	0.800	0.889	0.053
	Saint-Ours (1990-2004)	61	7	3.44 [10]	0.770	0.757	-0.022
<i>Mohu-Lav194</i>	St-Lawrence	143	11	8.16	0.818	0.830	0.012
	Chambly (1984)	30	9	8.62	0.933	0.868	-0.085
	Saint-Ours (1985)	26	9	8.48	0.808	0.808	-0.010
	Saint-Ours (1990-2004)	61	9	7.80	0.852	0.846	-0.011
<i>Mohu-Lav200</i>	St-Lawrence	143	16	9.69	0.818	0.816	-0.004
	Chambly (1984)	32	11	9.90	0.719	0.839	0.137
	Saint-Ours (1985)	28	9	8.54	0.714	0.838	0.141
	Saint-Ours (1990-2004)	61	15	10.72	0.852	0.824	-0.039
<i>Mohu-Lav203</i>	St-Lawrence	144	10	7.42	0.792	0.796	0.003
	Chambly (1984)	32	10	8.50	0.875	0.847	-0.042
	Saint-Ours (1985)	27	7	6.72	0.889	0.769	-0.169
	Saint-Ours (1990-2004)	60	8	7.01	0.683	0.766	0.104
<i>Mohu-Lav211</i>	St-Lawrence	143	13	10.92	0.832	0.831	-0.003
	Chambly (1984)	33	13	11.18	0.697	0.841	0.166
	Saint-Ours (1985)	25	13	11.96	0.880	0.860	-0.034
	Saint-Ours (1990-2004)	60	13	11.32	0.867	0.890	0.022

Locus	Locality	N	A	A <sub>R</sub>	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>
<i>Mohu-Lav212</i>	St-Lawrence	137	12	4.61 [10]	0.854	0.848	-0.009
	Chambly (1984)	--	--	--	--	--	--
	Saint-Ours (1985)	--	--	--	--	--	--
	Saint-Ours (1990-2004)	60	13	4.99[10]	0.883	0.868	-0.022
<i>Mohu-Lav213</i>	St-Lawrence	136	8	4.61[10]	0.779	0.762	-0.024
	Chambly (1984)	--	--	--	--	--	--
	Saint-Ours (1985)	--	--	--	--	--	--
	Saint-Ours (1990-2004)	58	7	4.99[10]	0.793	0.742	-0.074
<i>Mohu-Lav229</i>	St-Lawrence	142	18	12.18	0.775	0.757	-0.025
	Chambly (1984)	32	16	13.23	0.781	0.856	0.081
	Saint-Ours (1985)	28	10	8.96	0.714	0.675	-0.069
	Saint-Ours (1990-2004)	60	16	12.21	0.817	0.796	-0.031
<i>Mohu-Lav237</i>	St-Lawrence	143	15	11.58	0.888	0.906	0.018
	Chambly (1984)	30	13	12.00	0.833	0.885	0.051
	Saint-Ours (1985)	25	11	10.72	0.880	0.885	-0.005
	Saint-Ours (1990-2004)	61	12	10.55	0.869	0.884	0.013
<i>Mohu-Lav268</i>	St-Lawrence	144	15	9.81	0.708	0.741	0.042
	Chambly (1984)	29	15	12.62	0.862	0.767	-0.135
	Saint-Ours (1985)	20	13	13.00	0.850	0.836	-0.030
	Saint-Ours (1990-2004)	61	15	10.79	0.770	0.773	-0.001
<i>Mohu-Lav270</i>	St-Lawrence	143	14	11.27	0.783	0.883	0.111
	Chambly (1984)	31	12	11.02	0.871	0.900	0.025
	Saint-Ours (1985)	25	11	10.19	0.760	0.878	0.127
	Saint-Ours (1990-2004)	61	12	10.25	0.721	0.867	0.166
<i>Mohu-Lav277</i>	St-Lawrence	144	7	6.76	0.792	0.799	0.008
	Chambly (1984)	33	9	7.76	0.697	0.797	0.119
	Saint-Ours (1985)	25	8	7.75	0.800	0.822	0.017
	Saint-Ours (1990-2004)	61	7	6.81	0.738	0.729	-0.016
<i>Mohu-Lav286</i>	St-Lawrence	144	9	6.11	0.660	0.639	-0.034
	Chambly (1984)	30	8	7.18	0.567	0.649	0.120
	Saint-Ours (1985)	25	5	4.76	0.680	0.661	-0.039
	Saint-Ours (1990-2004)	60	8	6.16	0.583	0.582	-0.007

Locus	Locality	N	A	A <sub>R</sub>	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>
<i>Mohu-Lav294</i>	St-Lawrence	143	22	15.45	0.916	0.925	0.008
	Chambly (1984)	31	19	16.92	1.000	0.931	-0.083
	Saint-Ours (1985)	27	17	15.42	0.926	0.929	-0.006
	Saint-Ours (1990-2004)	61	20	15.50	0.918	0.936	0.015
<i>Mohu-Lav296</i>	St-Lawrence	143	23	16.13	0.965	0.936	-0.033
	Chambly (1984)	32	17	14.49	0.906	0.920	0.007
	Saint-Ours (1985)	28	19	16.69	0.964	0.931	-0.045
	Saint-Ours (1990-2004)	61	20	16.25	0.803	0.933	0.136
<i>Mohu-Lav305</i>	St-Lawrence	143	3	3.00	0.643	0.638	-0.010
	Chambly (1984)	32	4	3.63	0.500	0.654	0.231
	Saint-Ours (1985)	24	3	3.00	0.542	0.592	0.076
	Saint-Ours (1990-2004)	61	3	3.00	0.607	0.617	0.012
<i>Mohu-Lav306</i>	St-Lawrence	139	7	5.99 [120]	0.748	0.804	0.068
	Chambly (1984)	--	--	--	--	--	--
	Saint-Ours (1985)	--	--	--	--	--	--
	Saint-Ours (1990-2004)	61	7	6.00 [120]	0.852	0.813	-0.053
<i>Mohu-Lav321</i>	St-Lawrence	144	8	5.46	0.667	0.714	0.065
	Chambly (1984)	29	6	5.66	0.690	0.676	-0.029
	Saint-Ours (1985)	27	7	6.65	0.593	0.724	0.175
	Saint-Ours (1990-2004)	61	7	5.40	0.721	0.723	-0.002
<i>Mohu-Lav329</i>	St-Lawrence	142	8	6.24	0.655	0.759	0.136
	Chambly (1984)	33	7	6.54	0.697	0.707	0.007
	Saint-Ours (1985)	27	7	6.91	0.667	0.697	0.035
	Saint-Ours (1990-2004)	61	8	7.16	0.787	0.777	-0.017
<i>Mohu-Lav336</i>	St-Lawrence	144	9	6.51	0.653	0.716	0.087
	Chambly (1984)	31	8	7.16	0.806	0.766	-0.062
	Saint-Ours (1985)	26	6	5.94	0.692	0.715	0.022
	Saint-Ours (1990-2004)	61	7	6.24	0.787	0.712	-0.111
<i>Mohu-Lav347</i>	St-Lawrence	144	6	5.34	0.736	0.726	-0.015
	Chambly (1984)	32	6	5.80	0.844	0.748	-0.138
	Saint-Ours (1985)	26	5	4.54	0.615	0.596	-0.043
	Saint-Ours (1990-2004)	61	5	4.74	0.721	0.711	-0.019

**Table 3-3** Number of significant homogeneity tests between all pairs of sampling sites (lower triangle), and pairwise  $F_{ST}$  values (upper triangle).

$F_{ST}$	St. Lawrence	Chambly	Saint-Ours	Saint-Ours
	1999-2004	1984	1985	1990-2004
St. Lawrence (1999-2004)	0	0.0044	0.0024	0.0019
Chambly 1984	1		0.0072	0.0073
Saint-Ours 1985	0	1		0.0070
Saint-Ours (1990-2004)	0	2	0	

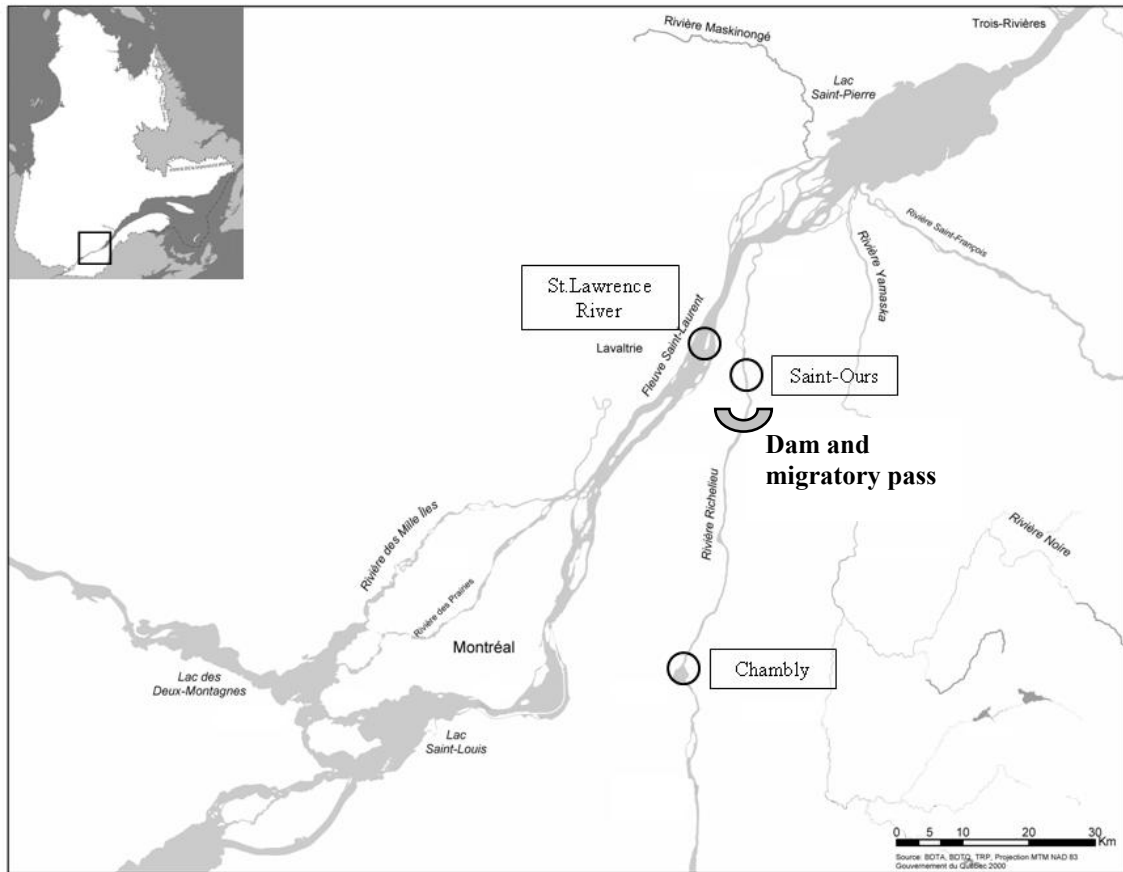
**Table 3-4** Estimates of the long-term and contemporary effective population sizes according to different methods (identified source and type of estimate).

Method	Source	Type and time period of estimate	Ne estimate
Heterozygosity-based	Ohta & Kimura (1973)	Long-term	4476 (SMM) 1674 (IAM)
Linkage disequilibrium	Hill (1981)	Parental generation [ $Gen(1) \sim 1985-90$ ]	480 [414-568]
Temporal methods			1 generation
MCLEEPS	Anderson <i>et al.</i> (2000)	Harmonic mean of the	260
MLNE	Wang (2001)	effective sizes	169 [107-357]
Moment-based	Waples (1989)	[ $Gen(0)$ to $Gen(1) \sim 1985/1985-90$ ]	116

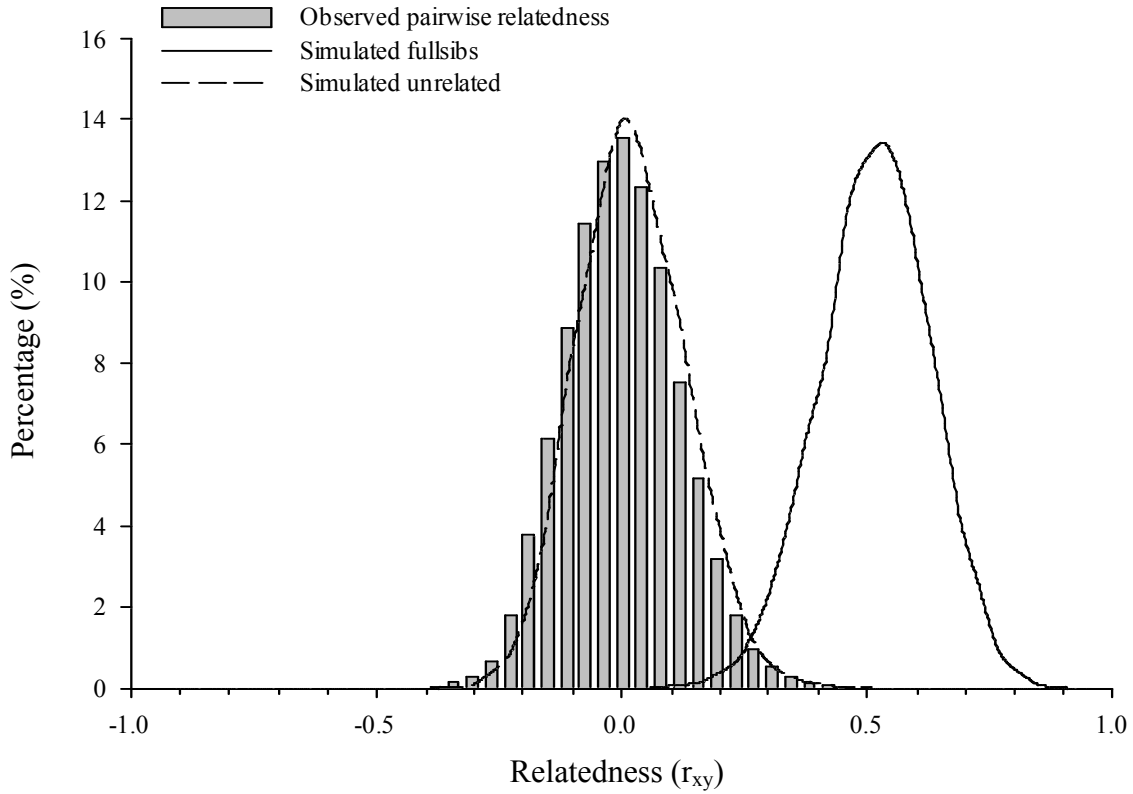
**Table 3-5** Expected heterozygosity ( $H_e$ ), expected heterozygosity under mutation-drift equilibrium ( $H_{eq}$ ), and excess (+) or deficit (-) in  $H_e$  according to Cornuet & Luikart (1996), and M ratio at each locus ( $M_C = 0.82$ ; Garza & Williamson 2001).

Locus	Bottleneck			M ratio
	$H_e$	$H_{eq}$	excess/deficit	
<i>DLU4296</i>	0.778	0.789	-	1.00
<i>DLU405</i>	0.776	0.788	-	1.00
<i>Mohu-Lav194</i>	0.836	0.829	+	0.79
<i>Mohu-Lav200</i>	0.814	0.893	-	0.89
<i>Mohu-Lav203</i>	0.791	0.811	-	0.67
<i>Mohu-Lav211</i>	0.844	0.858	-	1.00
<i>Mohu-Lav212</i>	0.858	0.844	+	1.00
<i>Mohu-Lav213</i>	0.763	0.762	+	0.89
<i>Mohu-Lav229</i>	0.762	0.906	-	0.86
<i>Mohu-Lav237</i>	0.905	0.878	+	0.94
<i>Mohu-Lav268</i>	0.74	0.877	-	0.83
<i>Mohu-Lav270</i>	0.882	0.868	+	1.00
<i>Mohu-Lav277</i>	0.799	0.728	+	0.78
<i>Mohu-Lav286</i>	0.649	0.788	-	1.00
<i>Mohu-Lav294</i>	0.926	0.92	+	0.96
<i>Mohu-Lav296</i>	0.934	0.923	+	0.96
<i>Mohu-Lav305</i>	0.642	0.414	+	1.00
<i>Mohu-Lav306</i>	0.811	0.728	+	1.00
<i>Mohu-Lav321</i>	0.715	0.763	-	0.44
<i>Mohu-Lav329</i>	0.754	0.762	-	0.67
<i>Mohu-Lav336</i>	0.714	0.79	-	0.82
<i>Mohu-Lav347</i>	0.723	0.684	+	0.67

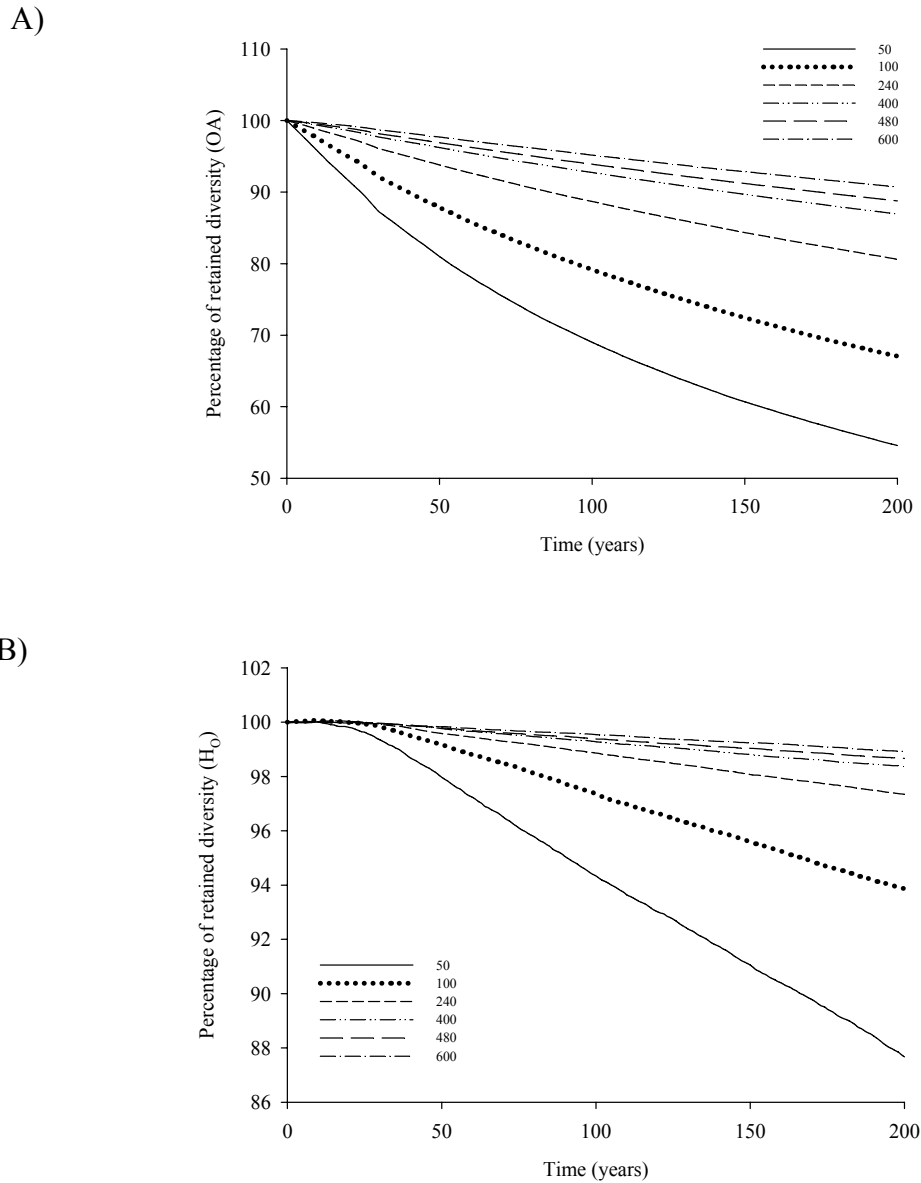




**Figure 3-1** Geographic distribution of the Copper redhorse in Quebec, Canada. Black circles represent the sampling sites (Saint-Ours, Chambly and St. Lawrence River).



**Figure 3-2** Percentage of pairwise relatedness ( $r_{xy}$ ; Queller & Goodnight 1989) values between all individuals sampled (histogram) compared to relatedness of simulated unrelated (dashed curve) and fullsibs (solid curve). The dotted vertical line denotes the critical threshold used to determine fullsibs among natural individuals (0.23).



**Figure 3-3** Evolution of genetic diversity over a 200-year period according to BOTTLESIM simulations, assuming different  $N_e$  values kept constant over time with the same initial genetic diversity. A) OA = observed number of alleles, B)  $H_0$  = observed heterozygosity. According to the percentage of retained observed number of alleles after 100 years, the minimal effective population size that should be aimed for the Copper redhorse is around 400.

## 4. Conclusion

Ce travail avait pour objectif principal d'analyser la distribution et l'évolution de la diversité génétique au sein du chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*), espèce menacée exclusive au Québec, pour ensuite tenter d'intégrer les données génétiques obtenues dans le plan de rétablissement mis en branle en 1995. Pour réaliser ce projet, plusieurs échantillons de nageoires, d'écaillés et d'os nous ont été fournis par le Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec en provenance de trois sites où des chevaliers cuivrés ont été observés depuis la découverte de l'espèce en 1942; Chambly, Saint-Ours et la région de Lavaltrie-Contrecoeur du fleuve Saint-Laurent. Cet échantillonnage non invasif aura permis l'atteinte de plusieurs objectifs visés par l'étude et de détailler certains aspects génétiques difficilement prédictibles. (1) 21 marqueurs microsatellites spécifiques au chevalier cuivré ont été développés et seront potentiellement utiles pour plusieurs autres membres de la famille des catostomidés, (2) le chevalier cuivré semble être représenté par une unique population effectuant des migrations entre le fleuve Saint-Laurent et la rivière Richelieu, (3) la diversité génétique au sein de l'espèce est étonnamment élevée comparé à ce que l'on aurait pu s'attendre étant donné la taille de population, (4) la population actuelle semble avoir subi un déclin graduel de sa taille effective permettant la rétention de la diversité génétique au cours du temps, ralentissement accentué par le long temps de génération de l'espèce, (5) aucun signe de consanguinité n'a été observé, ce qui aura permis d'effectuer de nombreux croisements non consanguins au cours de la reproduction artificielle de l'été 2004.

La réalisation de ce projet, étant donné qu'aucun marqueur génétique n'était disponible pour l'espèce, aura nécessité le développement de plusieurs marqueurs microsatellites polymorphiques spécifiques au chevalier cuivré. Ce long processus comporte plusieurs étapes fastidieuses, dont le clonage et la détection des clones positifs contenant un microsatellite ici accompli par BC Research Inc. (Vancouver, BC, Canada),

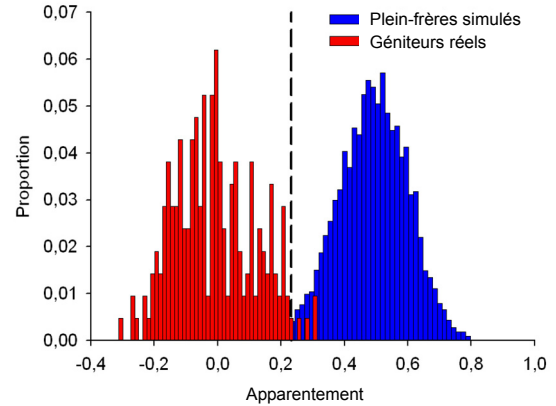
mais aussi la sélection des clones plasmidiques contenant les microsatellites potentiellement utilisables. À partir d'une banque de 384 clones, il nous a été possible de développer 36 paires d'amorces, dont 21 se sont révélées suffisamment polymorphiques pour l'étude visée en plus de correspondre aux autres critères de sélection finale, basée sur la diversité allélique (supérieure à 5) et la valeur d'hétérozygotie (supérieure à 0.50) au sein d'un groupe de 20 individus.

Grâce à ces marqueurs, nous avons démontré que le chevalier cuirré ne comprend qu'une seule population, représentant donc une seule unité de gestion (management unit, MU). Cette conclusion est d'ailleurs appuyée par un suivi annuel des captures de chevalier cuirré dans le fleuve Saint-Laurent, montrant une présence en plus grand nombre lors de la saison pré-fraie (Vachon & Chagnon 2004), ainsi que par les travaux de maîtrise de Simone Gariépy, étudiante à l'Université du Québec à Rimouski, portant sur la caractérisation des habitats essentiels du chevalier cuirré. Grâce à un projet de télémétrie, le déplacement de plusieurs individus a pu être suivi, permettant ainsi de mettre en évidence un phénomène de migration à partir du fleuve Saint-Laurent jusqu'au site de Chambly pour la période de fraie. La plupart des individus se déplacent ensuite vers la mi-juillet vers le fleuve pour retrouver les herbiers littoraux (Simone Gariépy, communication personnelle). Les membres du comité de rétablissement de l'espèce (Comité de rétablissement 2004) pourront utiliser ces résultats convergents dans le choix de plusieurs de ses actions. Premièrement, considérant qu'une recherche intensive n'a pu démontrer la présence de frayères dans le fleuve Saint-Laurent, ces observations supportent l'hypothèse voulant que tous les poissons frayent dans le Richelieu. Le comité de rétablissement devrait donc mettre considérablement d'emphase sur la protection, voire le réaménagement naturel des berges de cette rivière étant donné son importance lors de la reproduction naturelle du chevalier cuirré. De plus, étant donné l'absence de structure de population, il sera possible d'ensemencer différentes sections du fleuve Saint-Laurent et de la rivière Richelieu avec la progéniture du plan de reproduction artificielle au cours des prochaines années, en plus de pouvoir croiser des géniteurs de provenances différentes.

Nous avons par ailleurs documenté l'évolution de l'un des paramètres des plus cruciaux en conservation génétique mais aussi des plus complexes, la taille effective d'une population. Selon différents indices, le chevalier cuirvé a subi un déclin démographique important au cours des dernières décennies suite à l'urbanisation et à l'augmentation des activités agricoles. Les résultats de l'estimation de la taille effective contemporaine et historique du chevalier cuirvé par différentes méthodes statistiques indiquent qu'un déclin démographique aurait en effet eu lieu, mais étalé sur une plus grande échelle temporelle. L'absence de détection d'un goulot d'étranglement par deux méthodes différentes viendrait confirmer cette hypothèse. Cependant, le déclin sévère qui aurait affecté la population de chevaliers cuirvés durant les dernières années n'a pu être mis en évidence par l'examen génétique, le phénomène étant probablement trop récent pour avoir affecté l'hétérozygotie observée au sein de notre échantillonnage, composé seulement d'adultes. Cette hypothèse pourrait de plus expliquer pourquoi l'estimé de  $N_e$  de consanguinité est plus élevé que celui de  $N_e$  de variance. Une autre explication au fait qu'aucune des deux méthodes de détection de goulot d'étranglement n'ait été significative se base sur la définition même du goulot d'étranglement. À quel taux de perte d'effectif peut-on considérer un déclin démographique comme un goulot d'étranglement? En combien de temps le phénomène doit-il se produire pour être détecté par les méthodes ici employées? Nos résultats mettent en évidence une situation dans laquelle des facteurs, tels que l'histoire démographique d'une espèce, la vitesse de diminution d'une population, le temps de génération de l'espèce ou la composition en âge, ne peuvent être négligés dans l'interprétation des résultats. Négliger toutes ces variables pourrait définitivement mener à de fausses conclusions. Nos travaux contribuent donc à démontrer une fois de plus que malgré l'apparente simplicité des analyses, plusieurs facteurs peuvent entrer en ligne de compte pour influencer et complexifier les résultats et leur interprétation.

À ce travail de maîtrise s'est ajouté un côté beaucoup plus appliqué de l'utilisation de marqueurs génétiques. Les microsatellites développés auront permis une analyse d'apparentement entre une vingtaine de géniteurs potentiels lors du programme de reproduction artificielle en été 2004, démontrant ainsi que la population de chevaliers

cuivrés ne montre aucun signe de consanguinité (Figure 4-1). Il s'agit là d'un sujet de préoccupation très actuel dans le domaine de la conservation génétique. Nos résultats démontrent, en lien avec de récentes études, que la consanguinité ne fait pas obligatoirement partie du lot des petites populations.



**Figure 4-1** Proportion du degré d'apparentement entre les individus pleins-frères simulés (bleu) et les individus réels (rouge) échantillonnés pour le plan de reproduction artificielle

Cependant, même si les résultats de ce mémoire semblent généralement encourageants pour le chevalier cuivré, l'importance d'augmenter le recrutement par le biais d'un programme de reproduction artificielle n'en est pas pour autant diminuée pour la survie de l'espèce à long terme. Lorsque les vieux individus examinés aujourd'hui mourront, ils emporteront avec eux une grande partie de cette diversité génétique. Avec un objectif de conserver 90% de la diversité génétique observée aujourd'hui durant les 100 prochaines années, ce qui pour le chevalier cuivré représente environ 3 à 5 générations, il est primordial que ces individus lèguent leur héritage génétique à plus de jeunes que ce qui est observé en nature. Par le biais de la reproduction artificielle, le recrutement et la préservation de la diversité génétique seront optimisés. Suite à cette action du comité de rétablissement, je suggère fortement un suivi génétique au cours des prochaines années, et ce pour trois raisons majeures : (1) permettre d'agir dans le cas où l'on observerait un déclin dramatique de la diversité, ce qui impliquerait probablement un projet de reproduction en captivité afin d'augmenter la survie des jeunes, ou tout simplement des efforts supplémentaires dans le but d'augmenter le recrutement naturel (ce qui se fait présentement) (2) acquérir de l'information supplémentaire sur la façon dont la diversité génétique évolue au sein d'une espèce à long temps de génération, en connaissant l'évolution démographique réelle grâce aux estimations annuelles maintenant effectuées, 3)

connaître l'impact du programme de reproduction artificielle sur la population de Chevalier cuivré et sa diversité génétique au fils des ans.



## Bibliographie

- Amos W, Balmford A (2001) When does conservation genetics matter? *Heredity*, **87**, 257-265.
- Anderson E, Williamson E, Thompson E (2000) Monte Carlo Evaluation of the likelihood for  $N_e$  from temporally spaced samples. *Genetics*, **156**, 2109-2118.
- Ballou JD, Lacy RC (1995) Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in pedigreed populations. In: *Population management for survival and recovery: analytical methods and strategies in small populations conservation* (eds. Ballou JD, Gilpin M, Foose TJ), pp. 76-111. Columbia University Press, New York.
- Bartley D, Bagley M, Gall G, Bentley B (1992) Use of linkage disequilibrium data to estimate effective size of hatchery and natural fish populations. *Conservation Biology*, **6**, 365-375.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bernatchez L (2004) Considérations génétiques et protocole de reproduction relatifs au plan de rétablissement du chevalier cuirré (*Moxostoma hubbsi*). (Étude réalisée pour le compte du Ministère des Ressources naturelles, de la Faune et des Parcs, direction de l'aménagement de la faune de Montréal, de Laval et de la Montérégie, Longueuil et Pêches et Océans Canada, région du Québec), pp. viii + 38 p.
- Bernatchez L, Giroux M (2000) *Les Poissons d'eau douce du Québec et leur répartition dans l'est du Canada*. Éditions Broquet. Boucherville (Québec), 350 p.
- Berthier P, Beaumont MA, Cornuet J-M, Luikart G (2002) Likelihood-based estimation of the effective population size using temporal changes in allele frequencies: a genealogical approach. *Genetics*, **160**, 741-751.
- Bijlsma R, Gundgaard J, Boerema AC (2000) Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from *Drosophila*. *Journal of Evolution and Biology*, **13**, 502-514.
- Blouin M, Parsons M, Lacaille V, Lotz S (1996) Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*, **5**, 393-401.
- Branchaud A, Gendron A (1993) Artificial spawning and rearing of the Copper redhorse, *Moxostoma hubbsi* (Teleostei: Catostomidae). *The Canadian Field-Naturalist*, **107**, 279-282.
- Branchaud A, Jenkins B (1999) Pierre Fortin (1823-1888) et la première description scientifique du chevalier cuirré, *Moxostoma hubbsi*. *Canadian Field Naturalist*, **113**, 345-358.
- Branchaud A, Hatin D, Cayer P, Côté L, Dumont P, Fortin R (1995) Reproduction artificielle et élevage du suceur cuirré. (Québec, Ministère de l'Environnement et de la Faune, Direction régionale de Montréal, Laval, Lanaudière, Laurentides, Montérégie, Service de l'aménagement et de l'exploitation de la faune, Montréal), pp. 49 p.

- Burr BM, Morris MA (1977) Spawning behavior of the shorthead redhorse, *Moxostoma macrolepidotum*, in Big Rock Creek, Illinois. *Transactions of the American Fisheries Society*, **106**, 80-82.
- Cambray J (2000) 'Threatened fishes of the world' series, an update. *Environmental Biology of Fishes*, **59**, 353-357.
- Cambray J, Bianco P (1998) Freshwater fish crisis: a blue planet perspective. *Italian Journal of Zoology*, **65 (Suppl.)**, 345-356.
- Campton DE (1987) Natural hybridization and introgression in fishes: methods of detection and genetic interpretations. In: *Population genetics and fisheries management*. (eds. Ryman N, Utter F), pp. 161-192. Wahsington Sea Grant Program, University of Washington Press, Seattle, USA.
- Caro TM, Laurenson MK (1994) Ecological and genetic factors in conservation: a cautionary tale. *Science*, **263**, 485-486.
- Castric V, Bonney F, Bernatchez L (2001) Landscape structure and hierarchical genetic diversity in the brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Evolution*, **55**, 1016-1028.
- Ciofi C, Bruford MW (1999) Genetic structure and gene flow among Komodo dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. *Molecular Ecology*, **8**, S17-S30.
- Comité d'intervention (1995) Plan d'intervention pour la survie du suceur cuivré (*Moxostoma hubbsi*). Québec, ministère de l'Environnement et de la Faune, Direction de la faune et de ses habitats, 48 p.
- Comité d'intervention (1999) Plan d'intervention pour la survie du chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*). Société de la faune et des parcs du Québec, Direction de la faune et de ses habitats, 60 p.
- Comité de rétablissement (2004) Programme de rétablissement pour la survie du chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*) 2004-2008. Ministères des ressources naturelles, de la Faune et des Parcs, Direction du développement de la faune. Québec. 77 p.
- Cooke S, Bunt C, Hamilton S, Jennings C, Pearson M, Cooperman M, Markle D (2005) Threats, conservation strategies, and prognosis for suckers (Catostomidae) in North America: insights from regional case studies of a diverse family of non-game fishes. *Biological Conservation*, **121**, 317-331.
- Cornuet J, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.
- COSEWIC (In press) COSEWIC assessment and update status report on the copper redhorse *Moxostom hubbsi* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. ([www.sararegistry.gc.ca/status/status\\_e.cfm](http://www.sararegistry.gc.ca/status/status_e.cfm))
- Courtemanche M, Elliott M (1985) Identification des os de poissons provenant du site de Mandeville (CaFg-1). In: Dactylogramme, Université du Québec à Montréal (Ostéothèque de Montréal, Inc.), pp. 4.
- Crandall K, Posada D, Vasco D (1999) Effective population sizes: missing measures and missing concepts. *Animal Conservation*, **2**, 317-319.
- Crow J, Denniston C (1988) Inbreeding and variance effective population numbers. *Evolution*, **42**, 482-495.
- Crow JF, Kimura M (1970) *An introduction to population genetics theory*. Harper and Row, New York, USA.
- De Lafontaine Y, Gilbert NL, Dumouchel F, Brochu C, Moore S, Pelletier É, Dumont P, Branchaud A (2002) Is chemical contamination responsible for the decline of the

- copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*), an endangered fish species, in Canada. *The Science of the Total Environment*, **298**, 25-44.
- DeSalle R, Amato G (2004) The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, **5**, 702-712.
- DeWoody J, Avise J (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, **56**, 461-473.
- Di Rienzo A, Peterson A, Garza J, Valdes A, Slatkin M, Freimer N (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 3166-3170.
- Dieringer D, Schlötterer C (2003) MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 167-169.
- Dowling T, Marsh P, Kelsen A, Tibbets C (2005) Genetic monitoring of wild and repatriated populations of endangered razorback sucker (*Xyrauchen texanus*, Catostomidae, Teleostei) in Lake Mohave, Arizona-Nevada. *Molecular Ecology*, **14**, 123-136.
- Dowling T, Minckley W, Marsh P (1996a) Mitochondrial DNA diversity within and among populations of razorback sucker (*Xyrauchen texanus*) as determined by restriction endonuclease analysis. *Copeia*, **1996**, 542-550.
- Dowling T, Minckley W, Marsh P, Goldstein E (1996b) Mitochondrial DNA diversity in the endangered razorback sucker (*Xyrauchen texanus*): analysis of hatchery stocks and implications for captive propagation. *Conservation Biology*, **10**, 120-127.
- Dumont P, Leclerc J, Allard J-D, Paradis S (1997) Libre passage des poissons au barrage de Saint-Ours, rivière Richelieu. (Québec, Ministère de l'Environnement et de la Faune, Direction régionale de la Montérégie et Direction des ressources matérielles et des immobilisations, et ministère du Patrimoine canadien), pp. 88.
- Engels, WR (1993) Contributing software to the Internet: the *Amplify* program. *Trends in Biochemical Sciences*, **18**, 448-450.
- England P, Osler G, Woodworth L, Montgomery M, Briscoe D, Frankham R (2003) Effects of intense versus diffuse population bottlenecks on microsatellite genetic diversity and evolutionary potential. *Conservation Genetics*, **4**, 595-604.
- Estoup A, Angers B (1998) Microsatellites and minisatellites for molecular ecology : theoretical and empirical considerations. In: *Advances in molecular ecology* (ed. Carvalho GR), pp. 55-86. NATO Science series, IOS Press, Amsterdam.
- Ferris SD, Whitt GS (1980) Genetic variability in species with extensive gene duplication: The tetraploid Catostomid fishes. *The American Naturalist*, **115**, 650-666.
- Frankel OH, Soule ME (1981) *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frankham R (1995) Effective Population Size/Adult Population Size Ratios in Wildlife - a Review. *Genetical Research*, **66**, 95-107.
- Frankham R (1996) Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, **10**, 1500-1508.
- Frankham R, Montgomery ME, England PR, Lowe EH, Briscoe DA (1999) Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Animal Conservation*, **2**, 255-260.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Franklin IR (1980) Evolutionary changes in small populations. In: *Conservation Biology: an Evolutionary Ecological Perspective* (eds. Soulé ME, Wilcox BA), pp. 135-150. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Franklin IR, Frankham R (1998) How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation*, **1**, 69-73.
- French III JRP (1993) How well can fishes prey on Zebra mussels in Eastern North America? *Fisheries*, **18**, 13-19.
- Garza J, Williamson E (2001) Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, **10**, 305-318.
- Gendron A, Branchaud A (1991) Identification des oeufs de catostomidés récoltés au bassin de Chambly en juillet 1991. (Ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche, Service de l'aménagement et de l'exploitation de la faune), pp. 11.
- Gendron A, Branchaud A (1997) Impact potentiel de la contamination du milieu aquatique sur la reproduction du Suceur cuivré (*Moxostoma hubbsi*): Synthèse des connaissances. Québec, ministère de l'Environnement et de la Faune, Service de l'aménagement et de l'exploitation de la faune, Longueuil, Rapp. Tech. 16-02, xvi + 160 p.
- Gerber AS, Templeton AR (1996) Population sizes and within-deme movement of *Trimerotropis saxatilis* (Acrididae), a grasshopper with a fragmented distribution. *Oecologia*, **105**, 343-350.
- Gibbs HL, Prior KA, Weatherhead PJ, Johnson G (1997) Genetic structure of populations of the threatened eastern massasauga rattlesnake, *Sistrurus c. catenatus*: evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, **6**, 1123-1132.
- Goossens B, Chikhi L, Jalil M, Ancrenez M, Lackman-Ancrenez I, Mohamed M, Andau P, Bruford M (2005) Patterns of genetic diversity and migration in increasingly fragmented and declining orang-utan (*Pongo pygmaeus*) populations from Sabah, Malaysia. *Molecular Ecology*, **14**, 441-456.
- Gottelli D, Sillero-Zubiri C, Applebaum GD, Roy MS, Girman DJ, Garcia-Moreno J, Ostrander EA, Wayne RK (1994) Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology*, **3**, 301-312.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, **48**, 361-372.
- Hagelberg E (1994) Mitochondrial DNA from ancient bones. In: *Ancient DNA: Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical and forensic specimens* (eds. Herrmann B, Hummel S), pp. 195-205. Springer Verlag, New York.
- Haig SM (1998) Molecular contributions to conservation. *Ecology*, **79**, 413-425.
- Hansen MM (2002) Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Molecular Ecology*, **11**, 1003-1015.
- Hauser L, Adcock G, Smith P, Bernal Ramirez J, Carvalho G (2002) Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Science*, **99**, 11742-11747.
- Hedrick PW (1994) the natural history of inbreeding and outbreeding – theoretical and empirical perspectives – Thornhill, NW. *Science*, **263**, 107-108.

- Hedrick PW, Kalinowski ST (2000) Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review in Ecology and Systematics*, **31**, 139-162.
- Hill W (1981) Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. *Genetical Research*, **38**, 209-216.
- Hoelzel A (1999) Impact of population bottlenecks on genetic variation and the importance of life-history; a case study of the northern elephant seal. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 23-39.
- Johnson JA, Bellinger MR, Toepfer JE, Dunn P (2004) Temporal changes in allele frequencies and low effective population size in greater prairie-chickens. *Molecular Ecology*, **13**, 2617-2630.
- Kalinowski S (2004) Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*, **5**, 539-543.
- Knaepkens G, Bervoets L, Verheyen E, Eens M (2004) Relationship between population size and genetic diversity in endangered populations of the European bullhead (*Cottus gobio*): implications for conservation. *Biological Conservation*, **115**, 403-410.
- Kuo C, Janzen F (2003) BOTTLESIM: a bottleneck simulation program for long-lived species with overlapping generations. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 669-673.
- Kuo C, Janzen F (2004) Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics*, **5**, 425-437.
- La Haye M, Huot M (1995) Situation du suceur cuivré (*Moxostoma hubbsi*) au Québec: espèce susceptible d'être désignée menacée ou vulnérable. (Ministère de l'Environnement et de la Faune, Direction de la faune et des habitats), pp. 50.
- Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science*, **241**, 1455-1460.
- Lippé C, Dumont P, Bernatchez L (2004) Isolation and identification of 21 microsatellite loci in the Copper redhorse (*Moxostoma hubbsi*; Catostomidae) and their variability in other catostomids. *Molecular Biology Notes*, **4**, 638-641.
- Luikart G, Cornuet J-M (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, **12**, 228-237.
- Luikart G, Cornuet J-M (1999) Estimating the effective number of breeders from heterozygote excess in progeny. *Genetics*, **151**, 1211-1216.
- Lynch M, Lande R (1998) The critical effective size for a genetically secure population. *Animal Conservation*, **1**, 70-72.
- Lynch M, O'Hely M (2001) Captive breeding and the genetic fitness of natural populations. *Conservation Genetics*, **2**, 363-378.
- Mace GM, Lande R (1991) Assessing extinction threats: Toward a reevaluation of IUCN threatened species categories. *Conservation Biology*, **5**, 148-157.
- McNeely JA, Miller KR, Reid WV, Mittermeier RA, Werner TB (1990) *Conserving the World's Biological Diversity*, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, World Resources Institute, Conservation International, World Wildlife Fund US and the World Bank, Gland, Switzerland and Washington, DC.
- Minckley W, Marsh P, Deacon J, Dowling T, Hedrick P, Matthews W, Mueller G (2003) A conservation plan for native fishes of the lower Colorado River. *BioScience*, **53**, 219-234.

- Modde T, Irving DB (1998) Use of multiple spawning sites and seasonal movement by razorback suckers in the middle Green river, Utah. *North American Journal of Fisheries Management*, **18**, 318-326.
- Mongeau JR, Dumont P, Cloutier L (1986) La biologie du Suceur cuivré, *Moxostoma hubbsi*, une espèce rare et endémique à la région de Montréal, Québec, Canada. (Montréal, Ministère du Loisir, de la Chasse et de la Pêche, Service de l'aménagement et de l'exploitation de la faune), pp.137.
- Mongeau J-R, Dumont P, Cloutier L (1992.) La biologie du Suceur cuivré (*Moxostoma hubbsi*) comparée à celle de quatre autres espèces de *Moxostoma* (*M. anisurum*, *M. carinatum*, *M. macrolepidotum* et *M. valenciennesi*). *Canadian Journal of Zoology*, **70**, 1354-1363.
- Mundy NI, Winchell CS, Burr T, Woodruff DS (1997) Microsatellite variation and microevolution in the critically endangered San Clemente Island loggerhead shrike (*Lanius ludovicianus mearnsi*). *Proceeding of the Royal Society of London serie B*, **264**, 869-875.
- Nei M, Tajima F (1981) Genetic drift and estimation of effective population size. *Genetics*, **98**, 625-640.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, **29**, 1-10.
- Nielsen E, Hansen M, Loeschcke V (1997) Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years. *Molecular Ecology*, **6**, 487-492.
- Nunney L, Campbell KA (1993) Assessing viable population size: Demography meets population genetics. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **8**, 234-239.
- O'Connell M, Wright JM (1997) Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **7**, 331-363.
- Ohta T, Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic Research*, **22**, 201-204.
- Olsen JB, Wenburg JK, Bentzen P (1996) Semiautomated multilocus genotyping of Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.) using microsatellites. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **5**, 259-272.
- Ostéothèque de Montréal Inc. (1984) analyse zooarchéologique des ossements provenant du site Place Royage, Montréal (BjFj-3). Ostéothèque de Montréal Inc., Département des Sciences de la Terre, Université du Québec à Montréal, Rapport No 4: 63 pp.
- Pastor T, Garza JC, Allen P, Amos W, Aguilar A (2004) Low genetic variability in the highly endangered Mediterranean Monk seal. *Journal of Heredity*, **95**, 291-300.
- Peel D, Ovenden JR, Peel SL (2004) NEESTIMATOR: software for estimating effective population size, Version 1.3. Queensland Government, Department of Primary Industries and Fisheries.
- Piry S, Luikart G, Cornuet J (1999) BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.
- Potvin C, Berntachez L (2001) Lacustrine spatial distribution of landlocked Atlantic salmon populations assessed across generations by multilocus individual assignment and mixed-stock analyses. *Molecular Ecology*, **10**, 2375-2388.

- Pritchard J, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Pudovkin AI, Zaykin DV, Gedgecok D (1996) On the potential for estimating the effective number of breeders from heterozygote-excess in progeny. *Genetics*, **144**, 383-387.
- Queller D, Goodnight K (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, **43**, 258-275.
- Raymond M, Rousset F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**, 1280-1283.
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation biology*, **17**, 230-237.
- Ricciardi A, Rasmussen J (1999) Extinction rates of North American freshwater fauna. *Conservation Biology*, **13**, 1220-1222.
- Rice W (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Rozen S, Skaletsky HJ (1998) *Primer3*. Code available at [http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)
- Salgueiro P, Carvalho G, Collares-Pereira MJ, Coelho MM (2003) Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaocypris hispanica* in Portugal: implications for conservation. *Biological Conservation*, **109**, 47-56.
- Schwartz MK, Tallmon DA, Luikart G (1998) Review of DNA-based census and effective population size estimators. *Animal Conservation*, **1**, 293-299.
- Schwartz M, Tallmon D, Luikart G (1999) Using genetics to estimate the size of wild populations: many methods, much potential, uncertain utility. *Animal Conservation*, **2**, 321-323.
- Scoppettone GG, Coleman M, Wedemeyer GA (1986) Life history and status of the endangered Cui-ui of Pyramid lake, Nevada. U.S. Fish and Wildlife Service, *Fish and Wildlife Research*, **1**, 1-23.
- Spencer CC, Neigel JE, Leberg PL (2000) Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detection demographic bottlenecks. *Molecular Ecology*, **9**, 1517-1528.
- Tallmon D, Luikart G, Waples R (2004a) The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **19**, 489-496.
- Tallmon D, Luikart G, Beaumont M (2004b) Comparative evaluation of a new effective population size estimator based on approximate Bayesian computation. *Genetics*, **167**, 977-988.
- Templeton AR, Read B (1994) Inbreeding: one word, several meanings, much confusion. In: *Conservation genetics* (eds. Loeschcke V, Tomiuk J, Jain SK), pp. 91-105. Birkhauser, Basel, Switzerland.
- Tranah G, Agresti J, May B (2001) New microsatellite loci for suckers (Catostomidae): primer homology in *Catostomus*, *Chasmistes*, and *Deltistes*. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 55-60.
- Tyus HM (1987) Distribution, reproduction and habitat use of the razorback sucker in the Green river, Utah, 1979-1986. *Transactions of the American Fisheries Society*, **116**, 11-116.
- Uyeno T, Smith GR (1972) Tetraploid origin of the karyotype of catostomid fishes. *Science*, **175**, 644-646.
- Vachon N (1999) Écologie des juveniles 0+ et 1+ de chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*), une espèce menacée, comparée à celle des quatre autres espèces de *Moxostoma* (*M.*

- anisurum*, *M. carinatum*, *M. macrolepidotum*, *M. valenciennesi*) dans le système de la rivière Richelieu. Mémoire de maîtrise en sciences biologiques, Montréal, Université de Québec à Montréal. 191 p.
- Vachon N (2002) Variations interannuelles de l'abondance des chevaliers 0+ dans le secteur Saint-Marc de la rivière Richelieu de 1997 à 2001 avec une attention particulière portée au chevalier cuivré (*Moxostoma hubbsi*) Société de la faune et des parcs du Québec, Direction de l'aménagement de la faune de Montréal, de Laval et de la Montérégie, Longueuil, Rapp. Tech. 16-06, viii + 48 p.
- Vachon N, Chagnon Y (2004) Caractérisation des populations de chevaliers cuivré (*Moxostoma hubbsi*) du fleuve Saint-Laurent (secteur Lavaltrie-Contrecoeur) à partir des captures fortuites d'un pêcheur commercial en 1999, 2000 et 2001. Société de la faune et des parcs du Québec, Service de l'aménagement et de l'exploitation de la faune, Longueuil, Rapp. Tech. 16-16.
- Wang J (2001) A pseudo-likelihood method for estimating effective population size from temporally spaced samples. *Genetical Research*, **78**, 243-257.
- Wang J, Whitlock MC (2003) Estimating effective population size and migration rates from genetic samples over space and time. *Genetics*, **163**, 429-446.
- Waples R (1989) A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. *Genetics*, **121**, 379-391.
- Waples R (1991) Genetic methods for estimating the effective size of cetacean populations. In: *Genetic Ecology of Whales and Dolphins*, special issue 13 (ed. Hoelzel AR), pp. 279-300. International Whale Commission, London.
- Waples R, Teel D (1990) Conservation genetics of Pacific salmon I. Temporal changes in allele frequency. *Conservation Biology*, **4**, 144-156.
- Waples RS, Johnson OW, Aebersold PB, Shiflett CK, VanDoornik DM, Teel DJ, Cook AE (1993) A genetic monitoring and evaluation program for supplemented populations of salmon and steelhead in the Snake River Basin. Annual Report of Research to Bonneville Power Administration, Portland, OR, 179 p.
- Waples RS Genetic estimates of contemporary effective population size: To what time periods do the estimates apply? *Molecular Ecology*, (in review).
- Weber DS, Stewart BS, Lehman N (2004) Genetic consequences of a severe bottleneck in the Guadalupe fur Seal (*Arctocephalus townsendi*). *Journal of Heredity*, **95**, 144-153.
- Weir B, Cockerham C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Wenburg JK, Bentzen P, Foote C (1998) Microsatellite analysis of genetic population structure in an endangered salmonid: the coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*). *Molecular Ecology*, **7**, 733-749.
- Westemeier R, Brawn J, Simpson S, Esker T, Jansen R, Walk J, Kershner E, Bouzat J, Paige K (1998) Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science*, **282**, 1695-1698.
- Williamson EG, Slatkin M (1999) Using maximum likelihood to estimate population size from temporal changes in allele frequencies. *Genetics*, **152**, 755-761.
- Wilson EO (1988) *Biodiversité*. National Academy Press, Washington D.C., USA.
- Wise CA, Ranker TA, Linhart YB (2002) Modeling problems in conservation genetics with *Brassica rapa* : Genetic variation and fitness in plants under mild, stable conditions. *Conservation biology*, **16**, 1542-1554.
- Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**, 97-159.



Wright S (1969) *Evolution and the genetics of populations*. Vol. 2 : the theory of gene frequencies. University of Chicago Press, Chicago, USA.

